

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

Mémoire  
présenté à  
l'Université du Québec à Trois-Rivières

Comme exigence partielle  
pour l'obtention du grade de  
Maîtrise ès Sciences (Biophysique)

par

Thierry Le Bihan

Approche cinétique de la dénaturation thermique  
de l'actine: Contributions expérimentale et théorique

Juin 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Φεν τηζ βροτειαζ, πη προβησεται, φρενοζ; Τι  
τερμα τολμηζ και θρασονζ γενησεται.

Euripide, Hippolyte.

L'éternité c'est long, surtout vers la fin.

Citation tirée d'un hiéroglyphe d'une honorable  
toilette de l'U.Q.T.R.

## REMERCIEMENTS

Beaucoup de gens ont gravité autour de ce travail, entre autre, le célèbre docteur Claude Gicquaud, que je remercie pour l'attention, le support ainsi que la confiance qu'il a su m'accorder. Je tiens aussi à remercier mon père, Jean-Pierre qui, en plus de m'avoir aidé pour la rédaction de ce mémoire, m'a épaulé pour la composition d'affiches scientifiques et de publications antérieures. Il est une personne avec qui il est scientifiquement enrichissant de discuter.

J'aimerais remercier également Bernard Larue, pour des conseils concernant les transitions thermiques, Normand Beaudoin, pour la résolution de problèmes électroniques et mathématiques ainsi que Pierre Lavigne à la fois pour ses suggestions de lectures perspicaces et les discussions passionnées que l'on a pu avoir sur la structure des protéines.

Je tiens aussi à me remercier, car sans moi ce travail, je n'aurais certainement pas pu le faire\*.

Finalement, je tiens particulièrement à rendre grâce à mes nombreux petits amis(es) imaginaires; Jim Tordon, Smerf, Fernand F. Flibote Jr. et Joanna. Sans eux, je crois que je serais complètement cinglé à l'heure qu'il est.

---

\* N'y voyez pas là cher lecteur une forme d'égoïsme aiguë mais simplement une prise de conscience très tardive.

## **RÉSUMÉ**

L'analyse de la transition thermique d'une protéine, basée la plupart du temps sur une approche d'équilibre thermodynamique est généralement effectuée dans le but d'obtenir de l'information concernant la structure de cette protéine. L'obtention de ce type d'information à l'aide d'outils théoriques basés sur des lois thermodynamiques implique que cette transition thermique soit réversible, ce qui n'est pas toujours le cas. L'actine est justement une protéine dont la dénaturation est irréversible. Il en résulte que le comportement thermique de l'actine est en contradiction avec certains aspects inhérents à l'approche thermodynamique. Le but de ce travail est de caractériser la transition thermique de l'actine avec une approche cinétique, plus compatible avec son comportement thermique.

Le volet expérimental de ce travail consiste en la caractérisation thermique de l'actine G et F. Cette caractérisation est effectuée à l'aide de deux techniques différentes soit la calorimétrie différentielle à balayage et la fluorescence, afin d'obtenir des paramètres cinétiques les plus courants.

Concernant l'actine G, nous montrons clairement, à l'aide de ces deux techniques que sa dénaturation est un phénomène cinétique. Il s'agit d'un mécanisme d'ordre 1 dont la constante de vitesse varie en fonction de la température selon une loi d'Arrhénius.

Concernant l'actine F, étudiée aussi à l'aide des deux techniques mentionnées précédemment, nous montrons également que sa dénaturation peut être caractérisée par des lois cinétiques. Dans ce cas, le phénomène de dénaturation semble être un mécanisme d'ordre inférieur à l'unité. Un ordre de dénaturation inférieur à l'unité est souvent associé à des phénomènes de dépolymérisation ou de fragmentation.

Nous avons étudié l'effet de la phalloïdine sur l'actine. Une des propriétés de la phalloïdine est de réduire la dépolymérisation, et probablement la fragmentation du filament d'actine. Nous avons déterminé que la dénaturation thermique de l'actine F, en présence de phalloïdine, est un mécanisme d'ordre 1. D'autre part, nous avons

aussi montré que la phalloïdine pouvait interagir avec l'actine G. L'observation de la dénaturation par calorimétrie différentielle à balayage nous a amené à émettre certaines hypothèses sur cette interaction; la présence de phalloïdine diminue la concentration critique de l'actine et l'augmentation lente de la température favorise la polymérisation de l'actine qui peut alors interagir avec la phalloïdine.

L'utilisation de l'approche cinétique permet d'expliquer des comportements thermiques de l'actine sur la base d'hypothèses moins contraignantes que l'approche thermodynamique. Cette dernière approche est presque uniquement utilisée, malgré tout, pour caractériser les transitions thermiques.

Nous concluons que la transition thermique de l'actine ne peut être correctement décrite par un modèle d'équilibre thermodynamique et qu'il est préférable d'utiliser des lois cinétiques pour décrire le comportement thermique de l'actine.

<b>REMERCIEMENTS</b>	ii
<b>RÉSUMÉ</b>	iii
<b>TABLE DES MATIERES</b>	v
<b>LISTE DES FIGURES</b>	ix
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	xiii
<b>LISTE DES PRINCIPAUX SYMBOLES</b>	xiv
<b>1 INTRODUCTION</b>	01
<u>1.1 Description du problème</u>	01
<u>1.2 Buts fixés et limites du mémoire</u>	02
<u>1.3 Organisation du mémoire</u>	03
<b>2 ÉTAT DES CONNAISSANCES</b>	04
<u>2.1 Dénaturation thermique des protéines</u>	04
2.11 Effet de la température sur les protéines	05
2.12 Approche théorique de la dénaturation thermique des protéines	06
i) Phénomène réversible	06
ii) Phénomène irréversible	11
<u>2.2 Matériel biologique utilisé</u>	16
2.21 Actine	16
2.22 Phalloïdine	18
2.23 Interaction entre l'actine et la phalloïdine	20

<b>2.3 Études antérieures de la dénaturation thermique de l'actine</b> .....	20
<u>2.31 Revue de la littérature</u> .....	21
<u>2.32 Analyse critique du modèle de Bertazzon</u> .....	24
<u>2.33 Dénaturation de l'actine en présence de phalloïdine</u> .....	29
 <b>3 MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	30
 <b>3.1 Matériel biologique</b> .....	30
<u>3.11 Préparation de l'actine</u> .....	30
<u>3.12 Préparation de la phalloïdine</u> .....	30
 <b>3.2 Calorimétrie différentielle à balayage</b> .....	30
<u>3.21 Préparation des échantillons</u> .....	32
<u>3.22 Utilisation du calorimètre Microcal Mc-1</u> .....	34
<u>3.23 Utilisation du calorimètre Hart 7707</u> .....	34
 <b>3.3 Variation d'intensité de fluorescence</b> .....	34
<u>3.31 Préparation des échantillons d'actine G</u> .....	35
<u>3.32 Préparation des échantillons d'actine F</u> .....	36
 <b>4 ANALYSE THÉORIQUE DE LA TRANSITION THERMIQUE</b> .....	38
 <b>4.1 Calorimétrie différentielle à balayage</b> .....	38
<u>4.11 Simulation de thermogramme</u> .....	38
<i>i) Ordre de la dénaturation <math>n = 1</math></i> .....	39
<i>ii) Ordre de la dénaturation <math>n \neq 1</math></i> .....	43
<u>4.12 Méthodes de régression</u> .....	45
<i>i) Ordre de la dénaturation <math>n = 1</math></i> .....	46
<i>ii) Ordre de la dénaturation <math>n \neq 1</math></i> .....	49
<u>4.13 Évaluation de l'incertitude sur les coefficients</u> .....	51



<b>4.2 Analyse des résultats obtenus par fluorescence</b> .....	52
4.21 Ordre 1 .....	52
4.22 Ordre n .....	53
<b>4.3 Limitation des méthodes de calcul</b> .....	55
 <b>5 RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	58
 <b>5.1 Dénaturation thermique de l'actine G</b> .....	58
5.11 Cinétique de dénaturation thermique observée par fluorescence	58
i) <i>Effet de la température sur la cinétique de dénaturation</i> .....	58
ii) <i>Effet de la concentration sur la cinétique de dénaturation</i> ....	60
iii) <i>Relation d'Arrhénius</i> .....	61
5.12 Dénaturation thermique observée par D.S.C. ....	62
i) <i>Méthode du thermogramme simple</i> .....	62
ii) <i>Méthode des thermogrammes multiples</i> .....	65
5.13 Comparaison des résultats obtenus .....	67
 <b>5.2 Dénaturation thermique de l'actine F</b> .....	67
5.21 Cinétique de dénaturation thermique observée par fluorescence	67
i) <i>Effet de la concentration sur la cinétique de dénaturation</i> ....	68
ii) <i>Effet de la température sur la cinétique de dénaturation</i> .....	70
iii) <i>Relation d'Arrhénius</i> .....	71
5.22 Dénaturation thermique observée par D.S.C. ....	72
i) <i>Méthode du thermogramme simple</i> .....	72
ii) <i>Méthode des thermogrammes multiples</i> .....	76
5.23 Comparaison des résultats obtenus .....	78
 <b>5.3 Étude d'un cas: l'interaction entre l'actine et la phalloïdine</b> .....	79
5.31 Caractérisation qualitative de l'interaction .....	80
i) <i>Effet de la phalloïdine sur la thermostabilité de l'actine F</i> ....	80
ii) <i>Effet de la phalloïdine sur la thermostabilité de l'actine G</i> ....	81

5.32 Étude quantitative de l'interaction .....	83
i) Méthode du thermogramme simple .....	84
ii) Méthode des thermogrammes multiples .....	87
5.33 Modèle proposé .....	89
<b>5.4 Synthèse des observations</b> .....	91
5.41 Actine G .....	91
5.42 Actine F .....	92
5.43 Actine en présence de phalloïdine .....	93
<b>5.5 Signification des paramètres cinétiques</b> .....	95
<b>CONCLUSIONS</b> .....	99
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	102
<b>ANNEXE</b>	
<b>Annexe A</b> Relation entre la température de transition et la vitesse de balayage pour des ordres de dénaturation différents de l'unité .....	A1-A5
<b>Annexe B</b> Données brutes .....	B1-B17

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Figure de principe illustrant la dénaturation thermique d'une protéine obéissant à une transition réversible entre deux états.	08
Figure 2	Figure de principe illustrant la dénaturation thermique d'une protéine selon le modèle d'une transition irréversible entre deux états.	13
Figure 3	Schéma illustrant certaines caractéristiques de l'actine G et F.	16
Figure 4	Structure du monomère d'actine (tiré de Kabsch, W. et Vandekerckhove, J., 1992).	17
Figure 5	Principales phallotoxines provenant d'amanites.	19
Figure 6	Relation selon l'équation [16] entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine G et la vitesse de balayage ( $v$ ).	23
Figure 7	Tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine G obtenu par A. Bertazzon <i>et al</i> (1990) et interprétation thermodynamique du phénomène selon ces auteurs.	25
Figure 8	Interprétation cinétique du tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine G obtenu par A. Bertazzon <i>et al</i> (1990).	26
Figure 9	Tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine F obtenu par A. Bertazzon <i>et al</i> (1990) et interprétation thermodynamique du phénomène selon ces auteurs.	27

Figure 10	Interprétation cinétique du tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine F obtenu par A. Bertazzon <i>et al</i> (1990).	28
Figure 11	Principaux types de calorimètres différentiels à balayage.	31
Figure 12	Spectres d'intensité de fluorescence intrinsèque de l'actine G native et dénaturée.	35
Figure 13	Figure de principe illustrant l'effet de l'ordre de dénaturation sur la variation de capacité calorifique en fonction de la température.	56
Figure 14	Effet de la température sur la vitesse de dénaturation de l'actine G.	59
Figure 15	Effet de la concentration d'actine G sur sa vitesse de dénaturation.	60
Figure 16	Relation d'Arrhénius tracée à partir de courbes isothermales obtenues par fluorescence intrinsèque.	62
Figure 17	Tracé calorimétrique associé à la dénaturation thermique de l'actine G.	63
Figure 18	Relation d'Arrhénius tracée à partir du thermogramme de la figure 17.	64
Figure 19	Effet de la vitesse de balayage sur la dénaturation thermique de l'actine G.	65

Figure 20	Relation entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine G et la vitesse de balayage ( $v$ ).	66
Figure 21	Effet de la concentration de l'actine F sur sa vitesse de dénaturation.	68
Figure 22	Relation entre la concentration initiale d'actine F et le temps de demi-vie.	69
Figure 23	Effet de la température sur la vitesse de dénaturation de l'actine F.	70
Figure 24	Relation d'Arrhénius tracée à partir de courbes isothermales obtenues par fluorescence intrinsèque.	71
Figure 25	Tracé calorimétrique associé à la dénaturation thermique de l'actine F.	73
Figure 26	Graphique illustrant l'optimisation de l'intervalle par la relation entre la température finale ( $T_f$ ) et l'estimateur $\sigma_\epsilon^2$ .	74
Figure 27	Effet de la vitesse de balayage sur la dénaturation thermique de l'actine F.	77
Figure 28	Relation entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine F et la vitesse de balayage ( $v$ ).	78
Figure 29	Effet de la concentration de phalloïdine sur la dénaturation thermique de l'actine F.	80
Figure 30	Effet de la concentration de phalloïdine sur la dénaturation thermique de l'actine G.	82

Figure 31	Effet de la concentration de phalloïdine sur l'enthalpie calorimétrique associée à la dénaturation thermique de l'actine G et F.	83
Figure 32	Tracé calorimétrique associé à la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine pour des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité.	84
Figure 33	Graphique illustrant l'optimisation de l'intervalle par la relation entre la température finale ( $T_f$ ) et l'estimateur $\sigma_\epsilon^2$ .	85
Figure 34	Effet de la vitesse de balayage sur la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine pour des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité.	87
Figure 35	Relation entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine F en présence de phalloïdine pour des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité, et la vitesse de balayage ( $v$ ).	88
Figure 36	Schéma illustrant l'effet thermostabilisant de la phalloïdine sur le filament d'actine.	90
Figure 37	Figure de principe illustrant l'effet de la variation de l'énergie d'activation sur une simulation de thermogramme.	96
Figure 38	Figure de principe illustrant l'effet de la variation du facteur de collision sur une simulation de thermogramme.	97

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Comparaison des deux principaux modèles de dénaturation thermique.	15
Tableau 2	Bref historique de l'étude de la dénaturation thermique de l'actine G.	22
Tableau 3	Températures de transition de l'actine G obtenues par différents auteurs.	23
Tableau 4	Paramètres thermodynamiques de la dénaturation thermique de l'actine (valeurs utilisées par Bertazzon, A. <i>et al</i> (1990)).	24
Tableau 5	Solutions de travail.	33
Tableau 6	Paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine G évalués par différentes méthodes.	67
Tableau 7	Estimation des paramètres cinétiques en fonction de l'intervalle considéré: cas de l'actine F.	75
Tableau 8	Paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine F évalués par différentes méthodes.	79
Tableau 9	Estimation des paramètres cinétiques en fonction de l'intervalle considéré: cas de l'actine F en présence de phalloïdine.	86
Tableau 10	Paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine évalués par différentes méthodes.	89

## LISTE DES PRINCIPAUX SYMBOLES

$A$	: facteur de collision $((\text{mg}/\text{ml})^{(1-n)} \cdot \text{s}^{-1})$
$\alpha$	: fraction de protéine ayant réagi
$\alpha_m$	: fraction de protéine ayant réagi à $T = T_m$
$B$	: matrice des éléments
$c$	: concentration de protéine ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
$C$	: paramètre de normalisation
$C_p$	: variation de capacité calorifique molaire [utilisé par A. Bertazzon <i>et al</i> , 1990] ( $\text{kCal} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$D$	: état dénaturé de la protéine
$D$	: paramètre de normalisation
$[D]$	: concentration de l'état D ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ou $\text{mole} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$\Delta C_p$	: variation de capacité calorifique ( $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$\Delta C_{p_{\text{exp}}}$	: valeur de variation de capacité calorifique expérimentale ( $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$\Delta C_{p_{\text{max}}}$	: variation de capacité calorifique à la température de transition $T_m$ ( $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$\Delta C_{p_{\text{théor}}}$	: valeur de variation de capacité calorifique théorique ( $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$\Delta H$	: enthalpie molaire ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
$\Delta H_{\text{cal}}$	: enthalpie calorimétrique ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
$\Delta H_{\text{VH}}$	: enthalpie de Van't Hoff ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
$\Delta I$	: variation d'intensité de fluorescence
$\Delta P$	: différence de puissance entre deux cellules calorimétriques ( $\mu\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$ )
$\Delta s_i$	: erreur-type du coefficient $s_i$
$\Delta S$	: entropie molaire ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$E_a$	: énergie d'activation ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
$\xi$	: facteur de collision pondéré pour $n \neq 1$ ( $\text{s}^{-1}$ )
$f$	: facteur de normalisation
$f(\alpha)$	: fonction de $\alpha$
$F_N(T)$	: valeur normalisée de l'intensité de fluorescence à 320 nm au temps $t$
$\eta$	: quantité de protéine impliquée dans le processus de dénaturation (mole ou mg)



$k_{app}$	: constante de vitesse: $((\text{mg}/\text{ml})^{(1-n)} \cdot \text{s}^{-1})$
$K$	: constante d'équilibre
$L(T)$	: ligne de base sigmoïde $(\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1})$
$n$	: ordre du mécanisme de dénaturation
$N$	: nombre de données expérimentales utilisées pour la régression
$N$	: état natif de la protéine
$[N]$	: concentration de l'état $N$ ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ou $\text{mole} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$N_o$	: concentration initiale de l'état natif avant dénaturation ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ou $\text{mole} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$v$	: vitesse de balayage ( $^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$ ou $\text{K} \cdot \text{s}^{-1}$ )
$o_1$	: ordonné à l'origine de la variation de capacité calorifique avant transition $(\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1})$
$o_2$	: ordonné à l'origine de la variation de capacité calorifique après transition $(\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ ou $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1})$
$p_1$	: pente de la relation de la variation de capacité calorifique avant la transition $(\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-2}$ ou $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-2})$
$p_2$	: pente de la relation de la variation de capacité calorifique après la transition $(\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-2}$ ou $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-2})$
$Q_T$	: quantité totale de chaleur impliquée dans le processus de dénaturation ( $\mu\text{J}$ )
$Q(T)$	: quantité de chaleur impliquée dans le processus de dénaturation jusqu'à une température $T$ ( $\mu\text{J}$ )
$R$	: constante des gaz parfaits ( $0.008314 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
$s_j$	: élément du vecteur solution
$S$	: vecteur solution du système incompatible $B \cdot S = Y$
$\sigma_{\epsilon}^2$	: estimateur non biaisé de la variance ou distance moyenne entre une valeur expérimentale et théorique pour une même valeur en abscisse
$t$	: temps (s ou min)
$t_{1/2}$	: temps de demi-vie (s ou min)
$T$	: température ( $^{\circ}\text{C}$ ou $\text{K}$ )
$T_c$	: température critique ( $^{\circ}\text{C}$ ou $\text{K}$ )
$T_f$	: température finale ( $^{\circ}\text{C}$ ou $\text{K}$ )
$T_i$	: température initiale ( $^{\circ}\text{C}$ ou $\text{K}$ )
$T_m$	: température de transition ( $^{\circ}\text{C}$ ou $\text{K}$ )

- $v_{jj}$  : élément de la diagonale principale de la matrice  $V$
- $V$  : matrice de variance-covariance
- $Y$  : vecteur des constantes

## 1 INTRODUCTION

Étant donné l'aspect pluridisciplinaire et peu connu du sujet traité dans ce travail, nous présenterons en premier lieu, la problématique ainsi que les objectifs. Le lecteur sera alors en mesure de mieux comprendre le cheminement présenté par la suite.

### 1.1 Description du problème

La plupart des études de dénaturation thermique des protéines sont effectuées dans le but de mesurer certains changements moléculaires, de quantifier les forces mises en jeu pour stabiliser la structure tertiaire des protéines, ou simplement de vérifier les interactions possibles entre ligands et protéines. Ces types de mesures ne sont concevables que si la transition thermique étudiée est réversible et obéit, de ce fait, à des lois d'équilibre thermodynamique. La réversibilité de la transition thermique des protéines n'est possible que pour certaines protéines et dans des conditions bien spécifiques. Les protéines étudiées à l'aide de cette approche thermique sont généralement simples et ont une forme globulaire compacte. L'actine semblait, du moins à première vue, faire partie de ces protéines.

L'actine est une protéine impliquée dans plusieurs phénomènes de contraction et de motilité. L'actine existe sous deux formes: la forme globulaire (actine G) et la forme filamenteuse (actine F). Cette actine F consiste en un polymère hélicoïdal du monomère d'actine. Plusieurs études de dénaturation thermique de l'actine ont déjà été effectuées. Les résultats obtenus ne sont pas concordants et ont amené diverses interprétations des phénomènes thermiques observés.

L'étude de la dénaturation thermique de l'actine par une approche purement thermodynamique ne peut décrire de façon satisfaisante l'effet de la variation de certains paramètres sur son comportement, et l'utilisation de lois cinétiques doit donc être envisagée.

## 1.2 Buts fixés et limites du mémoire

Cette étude tentera de caractériser la dénaturation thermique de l'actine à l'aide d'une approche différente en faisant intervenir, entre autres, des lois cinétiques. La façon de procéder sera la suivante:

- 1<sup>er</sup> volet:** Nous ferons le point sur l'ensemble des travaux concernant la dénaturation thermique de l'actine, ainsi que sur les méthodes d'études cinétiques de la dénaturation thermique des protéines. Nous en profiterons à ce niveau pour évaluer la validité de l'approche cinétique sur les résultats de quelques auteurs ayant déjà abordé le problème de la dénaturation thermique de l'actine.
- 2<sup>ème</sup> volet:** Nous mettrons au point des outils mathématiques permettant à la fois de simuler des transitions thermiques ainsi que de traiter des résultats expérimentaux obtenus dans cette étude. Nous serons alors en mesure d'évaluer l'énergie d'activation, le facteur de collision ainsi que l'ordre de la réaction des résultats obtenus soit par calorimétrie différentielle à balayage soit par une méthode isothermale.
- 3<sup>ème</sup> volet:** Le volet expérimental de ce travail sera présenté pour confirmer la validité de l'approche cinétique de la dénaturation thermique de différentes formes d'actine (actine G, actine F et actine en présence de phalloïdine). Deux techniques complémentaires seront utilisées soit la calorimétrie différentielle à balayage et une technique isothermale (basée sur la variation d'intensité de fluorescence intrinsèque). L'utilisation combinée des deux techniques a pour but de démontrer l'hypothèse que la dénaturation thermique de l'actine est sous dépendance cinétique. Nous ferons une synthèse des résultats et vérifierons le lien entre les études calorimétriques et isothermales.

Quoiqu'il semble possible d'esquisser des lois qui régissent la dénaturation thermique de l'actine, nous n'avons pas tenté de trouver les mécanismes moléculaires responsables de ce type de dénaturation thermique irréversible.

### **1.3 Organisation du mémoire**

Ce présent travail suit l'ordre suivant:

Le chapitre 2 présente:

- Une synthèse des travaux antérieurs concernant des études générales de dénaturation thermique des protéines.
- Une description du matériel biologique utilisé lors de cette recherche soit: l'actine et la phalloïdine.
- Une analyse d'études antérieures sur la dénaturation thermique de l'actine et l'interprétation des résultats selon l'approche cinétique.

Le chapitre 3 décrit les types d'appareils et les méthodologies utilisés, tandis que la description du traitement mathématique fait l'objet du chapitre 4.

Les résultats obtenus et leur discussion sont présentés au chapitre 5 dans trois parties distinctes soit:

- Les données provenant de la dénaturation de l'actine G par calorimétrie différentielle à balayage et par fluorescence.
- Les données provenant de la dénaturation de l'actine F par calorimétrie différentielle à balayage et par fluorescence.
- Les données d'une étude de l'interaction entre la phalloïdine et l'actine.

Les conclusions sont regroupées au chapitre 6.

Les résultats bruts sont présentés en annexe sous forme de tableaux.

## 2 ÉTAT DES CONNAISSANCES

L'étude de la dénaturation thermique des protéines est relativement récente et la littérature a mis en évidence certaines ambiguïtés dans l'analyse du phénomène. Pour cette raison, nous avons séparé la description des phénomènes et leurs diverses interprétations.

### 2.1 Dénaturation thermique des protéines

La majorité des protéines naturelles adoptent une configuration tridimensionnelle unique. Les nombreux acides aminés qui composent la protéine peuvent s'organiser en une multitude de configurations possibles; toutefois la forme active des protéines, souvent compacte, est généralement unique. La forme compacte est attribuée aux forces autoassociatives (interactions hydrophobes). La structure unique serait due à certaines propriétés des acides aminés qui composent la chaîne peptidique, entre autres à des pontages hydrogènes spécifiques à l'intérieur de la protéine. D'autres forces tout aussi importantes quant au maintien de la structure active de la protéine peuvent être impliquées, tel la présence de cofacteur, d'ions particuliers, de pontage disulfure, etc... Une étude exhaustive de la structure des protéines est présentée par Creighton, T. (1991).

Il est admis que les interactions physiques qui contribuent au maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine sont coopératives. Diminuer la stabilité de l'une d'entre elles équivaut à diminuer globalement la stabilité des interactions. Le processus de repliement ou de déploiement, une fois amorcé, se poursuit généralement jusqu'à la fin (phénomène de coopérativité). Les protéines vont donc exister sous un des deux états possibles, natif (forme fonctionnelle et compacte) ou dénaturé (forme non fonctionnelle légèrement déployée ou totalement déployée). Alors que la structure native et compacte de la protéine semble unique, les configurations dénaturées, sont plus nombreuses.

Le phénomène d'autorepliement est associé à une base de repliement, ou domaine. Une protéine peut donc être composée de plusieurs domaines qui interagissent ou non entre eux.

L'étude des états dénaturés des protéines fait actuellement l'objet d'intenses recherches. L'état dénaturé de la protéine est un état qui peut être facilement obtenu et sert de référence pour l'étude des mécanismes de repliement et de stabilisation de la forme native. La transition entre les états natif et dénaturé est souvent caractérisée par des paramètres thermodynamiques (Privalov, P.L. *et al*, 1989). De telles études de dénaturation servent entre autres:

- à déterminer le nombre de domaines qui composent une protéine (Privalov, P.L., 1979; Ramsay, G. et Freire, E., 1990; Freire, E. *et al*, 1992),
- à quantifier des interactions possibles entre protéines et ligands quand la plupart des méthodes usuelles de mesures d'équilibre ne donnent pas de résultat (Brandts, J.F. et Lin, L.N., 1990).

### 2.11 Effet de la température sur les protéines

Les structures internes et externes des protéines peuvent être perturbées par une modification de leur environnement. Le phénomène de dénaturation thermique se produit lorsque les forces d'hydratation de résidus non polaires sont supérieures aux forces stabilisantes, telles les interactions de Van der Waals et les ponts hydrogènes qui semblent, selon Privalov, contribuer de façon comparable à la stabilisation de la forme compacte (Privalov, P.L. et Gill, S.G., 1988). Le potentiel d'hydratation des solutions augmente avec la température et, dans le cas des protéines, ce seuil critique est relativement peu élevé, normalement en deçà de 100°C. Généralement, le passage de la forme native, à la forme dénaturée, est réversible (Privalov, P.L., 1979) et peut donc être facilement caractérisé par une approche thermodynamique du phénomène. Toutefois, il peut arriver que la forme dénaturée de la protéine atteigne un état irréversible (Wetzel, R. *et al*, 1990). Une des causes les plus probables de cette irréversibilité est l'agrégation permanente de la protéine bien que Wetzel, R. *et al* (1990) suggèrent dans une étude exhaustive, d'autres causes.

Pour les petites protéines, peu complexes, le passage de la forme native à la forme dénaturée s'effectue de façon très coopérative et la population d'intermédiaires demeure assez faible. Pour les grosses protéines, plus complexes, il y aurait, au cours de la dénaturation, la coexistence d'états intermédiaires, en

raison de la présence de différents domaines.

Le passage d'un état compact à un état déployé peut s'observer en suivant diverses modifications physiques. Le déploiement provoque l'exposition des résidus non polaires internes à l'eau (ou autre solvant) ce qui provoque plusieurs modifications. Entre autres:

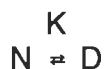
- augmentation de la capacité calorifique associée au transfert d'un composé non polaire à l'eau (Privalov, P.L. *et al*, 1989),
- effet bathochrome en intensité de fluorescence, associé au changement de polarité de certains acides aminés (Kuznetsova, I.M. *et al*, 1988)
- modification de la viscosité, de l'absorbance optique, de l'activité enzymatique etc...

## 2.12 Approche théorique de la dénaturation thermique des protéines

La transition de la forme native à la forme dénaturée induite par la chaleur peut être traitée de deux façons très différentes selon que l'on considère que la transition est réversible ou non.

### *i) Phénomène réversible*

La dénaturation thermique de beaucoup de petites protéines est réversible et le passage de la forme native à une forme dénaturée s'effectue avec très peu d'états intermédiaires. Il est alors simple d'utiliser une approche thermodynamique pour décrire le phénomène comme l'ont fait Chang, L-H. *et al* (1984). Le passage de la forme native (N) à la forme dénaturée (D) s'observe par une modification d'une propriété. Le degré de dénaturation ( $\alpha$ ) sera directement relié à la variation de la constante d'équilibre (K) entre les deux états.



$$K = [D]/[N] \quad [1]$$

N : état natif de la protéine



D	: état dénaturé de la protéine
K	: constante d'équilibre
[N]	: concentration de l'état N (mole · l <sup>-1</sup> )
[D]	: concentration de l'état D (mole · l <sup>-1</sup> )

A partir de la variation de la constante d'équilibre et de la température, plusieurs autres relations thermodynamiques fondamentales peuvent être déduites, en particulier:

$$K(T) = \exp(-\Delta H/RT) * \exp(\Delta S/R) \quad [2]$$

K(T)	: constante d'équilibre
T	: température (K)
$\Delta H$	: enthalpie molaire (kJ · mole <sup>-1</sup> )
$\Delta S$	: entropie molaire (kJ · mole <sup>-1</sup> · K <sup>-1</sup> )
R	: constante des gaz parfaits (0.008314 kJ · mole <sup>-1</sup> · K <sup>-1</sup> )

Plusieurs propriétés physiques, chimiques ou enzymatiques permettent de différencier la forme native de la forme dénaturée. Le paramètre observé peut être directement relié au degré de dénaturation ( $\alpha$ ) correspondant à la fraction de protéine dénaturée:

$$\alpha = [D] / ([N] + [D]) \quad [3]$$

$$\alpha = K / (1 + K) \quad [4]$$

$$K = \alpha / (1 - \alpha) \quad [5]$$

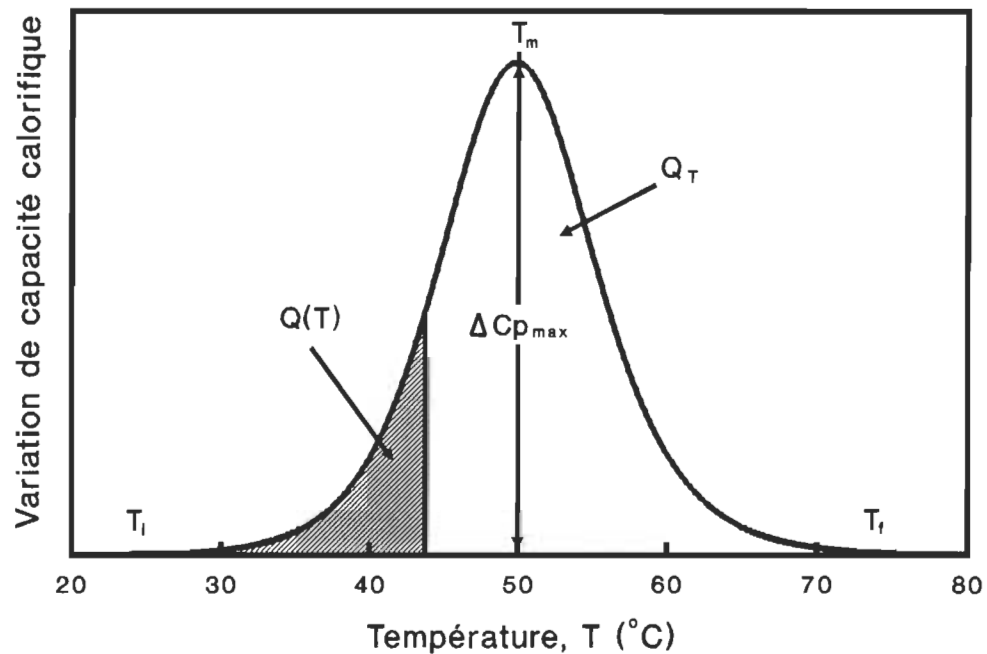
où [N] + [D] est constant

Une des propriétés physiques qui est utilisée pour suivre la dénaturation thermique des protéines est la variation de la capacité calorifique pouvant être mesurée par calorimétrie différentielle à balayage. On peut déduire certains paramètres par cette technique. A pression (p) constante, la variation de capacité calorifique,  $\Delta C_p$ , est directement reliée à la mesure de la quantité de chaleur  $\partial Q(T)$  requise pour augmenter la température de la protéine dans l'intervalle  $\partial T$ :

$$\Delta C_p = \left( \frac{\partial Q(T)}{\partial T} \right)_p \quad [6]$$

$\Delta C_p$  : variation de capacité calorifique  
 $Q(T)$  : quantité de chaleur impliquée dans le processus de dénaturation

La quantité de chaleur,  $Q(T)$ , impliquée dans le processus de dénaturation étant proportionnelle au degré de dénaturation,  $\alpha$  (Privalov, P.L., 1979)  $\Delta C_p$  est donc proportionnel à  $d\alpha/dT$  selon l'équation [6]. Un exemple typique de tracé calorimétrique est illustré à la figure 1. La transition observée correspond à la dénaturation d'une protéine obéissant à des lois thermodynamiques simples. L'aire totale sous la courbe,  $Q_T$ , représente la quantité de chaleur impliquée dans le processus et la température de transition,  $T_m$ , correspond au maximum de la relation  $\Delta C_p$  vs  $T$ .



**Figure 1:** Figure de principe illustrant la dénaturation thermique d'une protéine obéissant à une transition réversible entre deux états.

Un des avantages de la calorimétrie différentielle à balayage est qu'il est possible d'en déduire l'enthalpie réelle (calorimétrique) du processus ainsi que l'enthalpie de Vant'Hoff.

L'enthalpie calorimétrique est déterminée à partir de la courbe  $\Delta C_p$  en fonction de la température (tracé calorimétrique) et correspond à l'aire totale sous la courbe,  $Q_T$ , divisée par le nombre de moles de protéine impliquée.

$$\Delta H_{cal} = \frac{Q_T}{\eta} = \int_{T_i}^{T_f} \Delta C_p(T) dT \quad [7]$$

- $\Delta H_{cal}$  : enthalpie calorimétrique ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
- $\eta$  : quantité de protéine impliquée dans le processus de dénaturation (mole)
- $T_i$  : limite inférieure de l'intervalle de température ( $^{\circ}\text{C}$  ou K)
- $T_f$  : limite supérieure de l'intervalle de température ( $^{\circ}\text{C}$  ou K)

L'enthalpie de Vant'Hoff s'obtient du tracé calorimétrique selon la relation suivante (Privalov, P.L., 1979):

$$\Delta H_{VH} = \frac{4RT_m^2 \Delta C_{p_{max}}}{Q_T} \quad [8]$$

- $\Delta H_{VH}$  : enthalpie de Vant'Hoff ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
- $T_m$  : température de transition (K)
- $\Delta C_{p_{max}}$  : variation de la capacité calorifique à  $T_m$  ( $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1}$ )

Une autre quantité souvent utilisée, le rapport de coopérativité, se définit comme le rapport des deux types d'enthalpies soit:  $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ . Cependant, certains auteurs représentent le rapport de coopérativité comme étant l'inverse soit  $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$  (Privalov, P.L., 1979) ce qui peut introduire une certaine confusion quand à la signification de cette valeur.

Plusieurs petites protéines globulaires ont un rapport de coopérativité ( $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ ) proche de l'unité (Privalov, P.L., 1979), ce qui signifie qu'il n'existe que deux états possibles, l'état natif et l'état dénaturé, sans intermédiaire (modèle binaire). La protéine constitue dans ce cas un domaine en soi, parfois nommé unité

coopérative de base.

Un rapport coopératif différent de l'unité reflète des écarts vis-à-vis du modèle binaire de dénaturation. Un rapport coopératif supérieur à l'unité serait l'indice d'une coopérativité entre les protéines ou entre les molécules considérées comme "unité moléculaire". Un rapport inférieur à l'unité indiquerait que la protéine est composée de domaines plus ou moins indépendants ou qu'il existe des états intermédiaires entre la forme native et la forme dénaturée (Bertazzon, A. *et al*, 1990).

Les protéines se dénaturant selon un processus réversible et ayant un rapport de coopérativité égal à l'unité (modèle binaire réversible) vont obéir à la relation suivante (Chang, L.H. *et al*, 1984):

$$\Delta C_p(T) = \frac{\eta \Delta H^2}{RT^2} \frac{\exp \left[ \left( -\frac{\Delta H}{R} \right) \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \right]}{\left( 1 + \exp \left[ \left( -\frac{\Delta H}{R} \right) \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \right] \right)^2} \quad [9]$$

- $\eta$  : quantité de protéine impliquée dans le processus de dénaturation (mole)
- $\Delta H$  : enthalpie molaire ( $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ )
- $R$  : constante des gaz parfaits ( $0.008314 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
- $T_m$  : température de transition (K)
- $\Delta C_p$  : variation de la capacité calorifique ( $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1}$ )
- $T$  : température (K)

Il est à remarquer que, selon cette équation,  $T_m$  et  $\Delta H$  sont les seuls paramètres qui déterminent la forme de la transition. La relation  $\Delta C_p$  vs  $T$ , ainsi exprimée, est indépendante de la vitesse de balayage. La relation est symétrique par rapport à la température de transition. Cette symétrie est illustrée à la figure 1 qui utilise cette équation [9]. Le rapport de coopérativité étant égal à l'unité,  $\Delta H = \Delta H_{\text{cal}} = \Delta H_{\text{VH}}$ . Les transitions réversibles plus complexes font souvent intervenir des variantes de cette même équation.

ii) *Phénomène irréversible*

Le passage d'un état natif (N) à un état dénaturé de façon irréversible (I) et obéissant à des lois cinétiques simples peut s'illustrer par:



$k_{app}$  : constante de vitesse ( $s^{-1}$ )

Cette expression est la simplification du phénomène suivant:



Lorsque  $k_3 \gg k_2$ , la majorité des molécules dans l'état D sont converties en état I au lieu de N, d'où l'absence d'équilibre entre les états N et D. Le processus de dénaturation irréversible illustré par l'équation [10] montre assez bien que la dénaturation irréversible d'une protéine n'est pas un processus complètement différent d'un mécanisme réversible; cette irréversibilité n'est souvent qu'associée à une étape finale lors d'une transition thermique. Les causes de cette irréversibilité sont nombreuses, mais on peut les regrouper en deux classes principales: soit un processus covalent, ou bien une modification de la structure de la protéine. (Wetzel, R. *et al*, 1990; Freire, E. *et al*, 1990).

Contrairement aux transitions réversibles, il y a peu de principes généraux régissant l'interprétation des transitions irréversibles (Freire, E. *et al*, 1990), mais les cas simples (Sanchez-Ruiz, J.M. *et al*, 1988) peuvent être décrits par:

*1<sup>ère</sup> hypothèse*: L'ordre (n) de la réaction est égal à l'unité.

$$\frac{dN}{dt} = -k_{app} N^n = -k_{app} N \quad [11]$$

2<sup>ème</sup> hypothèse: La variation de la constante de vitesse ( $k_{app}$ ) en fonction de la température obéit à une loi d'Arrhénus.

$$k_{app}(T) = A \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \quad [12]$$

$t$  : temps (s)  
 $A$  : facteur de collision ( $s^{-1}$ )  
 $Ea$  : énergie d'activation ( $kJ \cdot mole^{-1}$ )  
 $k_{app}(t)$  : constante de vitesse ( $s^{-1}$ )  
 $T$  : température (K)

Des cas plus complexes ont été envisagés. Sanchez-Ruiz, J.M. (1992) a décrit des réactions d'ordre ( $n$ ) différents de l'unité. Galisteo, M.L. *et al* (1991) ont observé que la relation entre  $k_{app}$  et  $T$  diffère parfois de la relation d'Arrhénus.

Lorsque la dénaturation est observée par la variation de capacité calorifique ( $\Delta Cp$ ), il est possible, en utilisant les équations [11] et [12] d'obtenir une relation entre  $\Delta Cp$  et  $T$  en appliquant les deux hypothèses mentionnées plus haut:

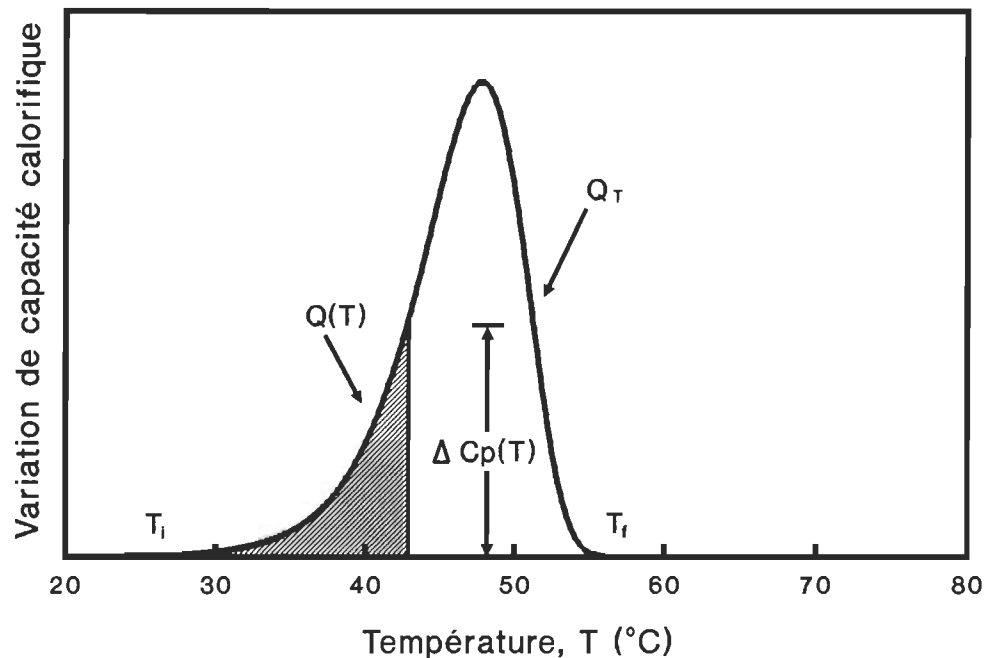
$$\Delta Cp(T) = \frac{\eta A \Delta H_{cal}}{\nu} \exp \left[ -\frac{Ea}{RT} - \frac{A}{\nu} \int_{T_i}^T \exp \left( -\frac{Ea}{RT} \right) dT \right] \quad [13]$$

Conejero-Lara F. *et al* (1991) en intégrant cette équation [13] ont exprimé le même comportement par la relation suivante:

$$\Delta Cp(T) = \frac{\eta Ea \Delta H_{cal}}{RT_m^2} \exp \left( \frac{Ea \Delta T}{RT_m^2} \right) \exp \left[ -\exp \left( \frac{Ea \Delta T}{RT_m^2} \right) \right] \quad [14]$$

$A$  : facteur de collision ( $s^{-1}$ )  
 $\eta$  : quantité initiale de protéine (mole)  
 $\nu$  : vitesse de balayage ( $K \cdot s^{-1}$ )  
 $Ea$  : énergie d'activation ( $kJ \cdot mole^{-1}$ )  
 $\Delta H_{cal}$  : enthalpie calorimétrique ( $kJ \cdot mole^{-1}$ )  
 $T_m$  : température de transition (K)  
 $\Delta T = T - T_m$

Dans l'équation [14], la température de transition ( $T_m$ ) regroupe certaines variables cinétiques et masque l'influence de certains paramètres (l'effet de la vitesse de balayage entre autres). Le passage de l'équation [13] à [14] amène également les auteurs à des simplifications, limitant sa validité au voisinage de la température de transition. Le graphique de cette équation [14] est montré à la figure 2. Cette schématisation de la dénaturation selon un modèle binaire irréversible est nettement différent du modèle de la figure 1 (modèle binaire réversible) par son asymétrie.



**Figure 2:** Figure de principe illustrant la dénaturation thermique d'une protéine selon le modèle d'une transition irréversible entre deux états.

L'obtention des paramètres cinétiques  $E_a$  et  $\ln(A)$ , à partir de données calorimétriques (modèle binaire irréversible) peut s'effectuer de deux façons selon que l'on utilise a) un thermogramme simple b) des thermogrammes multiples obtenus dans les mêmes conditions mais à des vitesses de balayage différentes. Ces deux méthodes, ont été développées par Sanchez-Ruiz, J.M. *et al* (1988).

**Thermogramme simple:** A partir d'une seule transition thermique, il est possible d'évaluer, à une température donnée, la constante de vitesse:

$$k_{app}(T) = \frac{v \Delta Cp(T)}{(Q_T - Q(T))} \quad [15]$$

$\nu$	: vitesse de balayage ( $K \cdot s^{-1}$ )
$T$	: température quelconque (K)
$\Delta Cp(T)$	: variation de capacité calorifique à une température $T$ ( $\mu J \cdot K^{-1}$ )
$Q_T$	: aire sous la courbe (quantité de chaleur associée à la transition ( $\mu J$ ))
$Q(T)$	: aire sous la courbe jusqu'à une température $T$ (quantité de chaleur associée à la transition jusqu'à une température $T$ ) ( $\mu J$ )
$k_{app}(T)$	: constante de vitesse ( $s^{-1}$ )

La signification des termes est schématisée à la figure 2.

Les paramètres cinétiques  $E_a$  et  $\ln(A)$  sont obtenus par une solution graphique simple de la loi d'Arrhénius.

**Thermogrammes multiples:** Lorsque l'on dispose de plusieurs thermogrammes obtenus à des vitesses de balayage différentes, Sanchez-Ruiz, J.M. *et al* (1988) utilisent l'équation [16]:

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E_a} \exp\left(-\frac{E_a}{RT_m}\right) \quad [16]$$

Les paramètres cinétiques  $E_a$  et  $\ln(A)$  sont obtenus par régression linéaire dans l'espace graphique  $\ln(v/T_m^2)$  vs  $1/T_m$ . La pente de cette régression correspond à  $-E_a/R$  et l'ordonnée à l'origine à  $\ln(AR/E_a)$ .

Le tableau 1 résume les caractéristiques du modèle thermodynamique et du modèle cinétique de dénaturation thermique.



**Tableau 1**

Comparaison des deux principaux modèles de dénaturation thermique: cas de la relation  $\Delta C_p$  en fonction de la température

Paramètres considérés	Modèle thermodynamique	Modèle cinétique
Réversibilité de la transition	réversible	irréversible
Effet de la vitesse de balayage	aucun effet majeur	modification de la température de transition
Forme de la transition (transition simple)	symétrique	asymétrique
Paramètres mesurés	$\Delta H_{VH}$ , $\Delta H_{cal}$ , $T_m$	$E_a$ , $A$ , $\Delta H_{cal}$
Variables contrôlées modifiant la forme de transition <sup>1</sup>	la concentration <sup>2</sup>	$v$ , la concentration <sup>3</sup>

1 On exclut ici les variables telles: variation de pH, de force ionique, ajout de ligand etc.

2 La concentration de protéine peut avoir une influence sur la température de transition lors de phénomène de dissociation ou d'agrégation réversible par exemple (Manly, S. *et al*, 1985).

3 La concentration de protéine a un effet sur les transitions pour des ordres de dénaturation différents de l'unité (Sanchez-Ruiz, J.M., 1992).

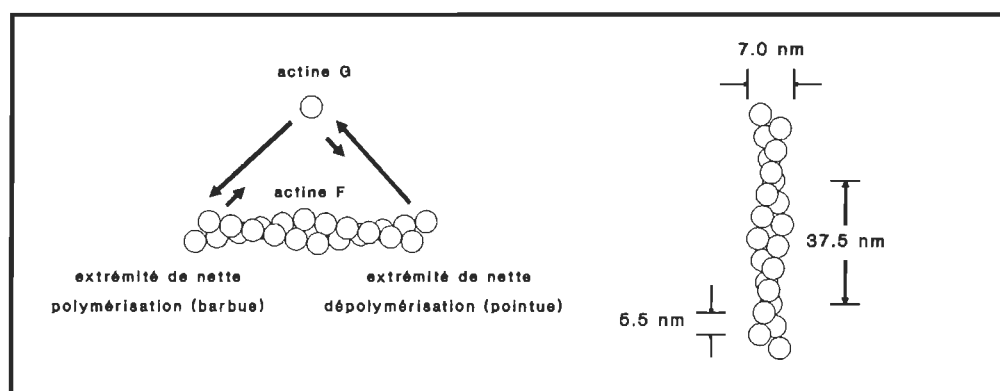
L'approche cinétique de la transition thermique est relativement récente dans le domaine des protéines. Largement utilisée et documentée en chimie analytique et en thermochimie, cette approche à parfois fait l'objet de certaines critiques (Arnold M. *et al*, 1979).

## 2.2 Matériel biologique utilisé

L'actine et la phalloïdine constituent les deux molécules utilisées dans cette étude et sont décrites dans les sections suivantes.

### 2.21 Actine

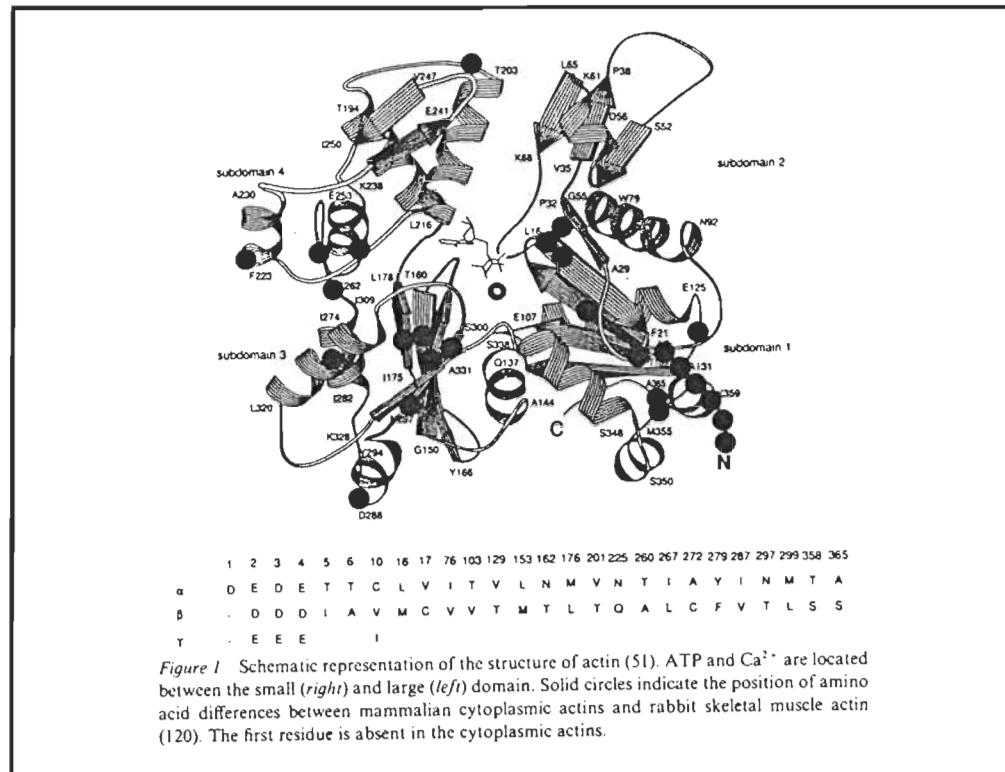
L'actine est une protéine impliquée dans plusieurs phénomènes tels la contraction musculaire ou la formation du cytosquelette. Cette protéine existe sous deux aspects; la forme globulaire (actine G) et la forme filamenteuse (actine F).



**Figure 3:** Schéma illustrant certaines caractéristiques de l'actine G et F.

L'actine G est une protéine globulaire, son poids moléculaire est de 42,5 kDa. Le monomère d'actine comprend 375 acides aminés (Korn, E., 1982). Le monomère a une forme ovoïde d'environ 3.5 par 5.5 nm et une charge nette négative. Sa structure, déterminée par diffraction des rayons X, est schématisée à la figure 4 (Kabsch, W. *et al*, 1990). L'actine G est composée de deux domaines; ses deux extrémités (amino et carboxy terminal) sont historiquement situées dans le plus petit domaine, bien que la figure 4 montre que les deux domaines semblent être de mêmes dimensions. L'actine G possède normalement un nucléotide, l'ATP et un cation divalent (généralement un ion calcium) à un site spécifique. Kabsch, W. *et al* (1990) ont montré que le site ATP se situe entre les deux domaines de l'actine. Les groupes phosphates du nucléotide interagissent avec la ser 14, gly 15 et leu 16 du

"petit" domaine tandis que la partie nucléoside interagit avec divers sites se situant sur le "grand" domaine. Ces auteurs n'ont pu préciser la nature des liaisons des interactions spécifiques entre les acides aminés et l'ATP (Kabsch, W. *et al*, 1990).



**Figure 4:** Structure du monomère d'actine (tiré de Kabsch, W. et Vandekerckhove, J., 1992).

Le cation se trouve inséré profondément à l'intérieur d'une poche hydrophile formée à la fois par les groupes phosphates du nucléotide ainsi que par les résidus Asp 11 Gln 137 et Asp 154 de l'actine. Toutefois, ces résidus semblent n'avoir qu'un rôle secondaire dans la coordination de l'ion  $\text{Ca}^{+2}$  car les distances séparant le  $\text{Ca}^{+2}$  de ces acides aminés sont relativement grandes. La présence de ce cation est essentiel à la structure compacte de l'actine G (Valentin-Ranc, C. et Carlier, M.F., 1991). L'actine G a aussi des sites de faibles affinités pour des cations mono- di- et trivalent. L'occupation de ces sites secondaires réduit la charge négative de l'actine et induit la polymérisation.

L'actine F est un polymère de l'actine G. La polymérisation commence par une phase de nucléation et se poursuit par une phase d'élongation du filament. La croissance s'effectue aux deux extrémités, mais à des vitesses différentes. Une molécule d'ATP est hydrolysée lors de la polymérisation.

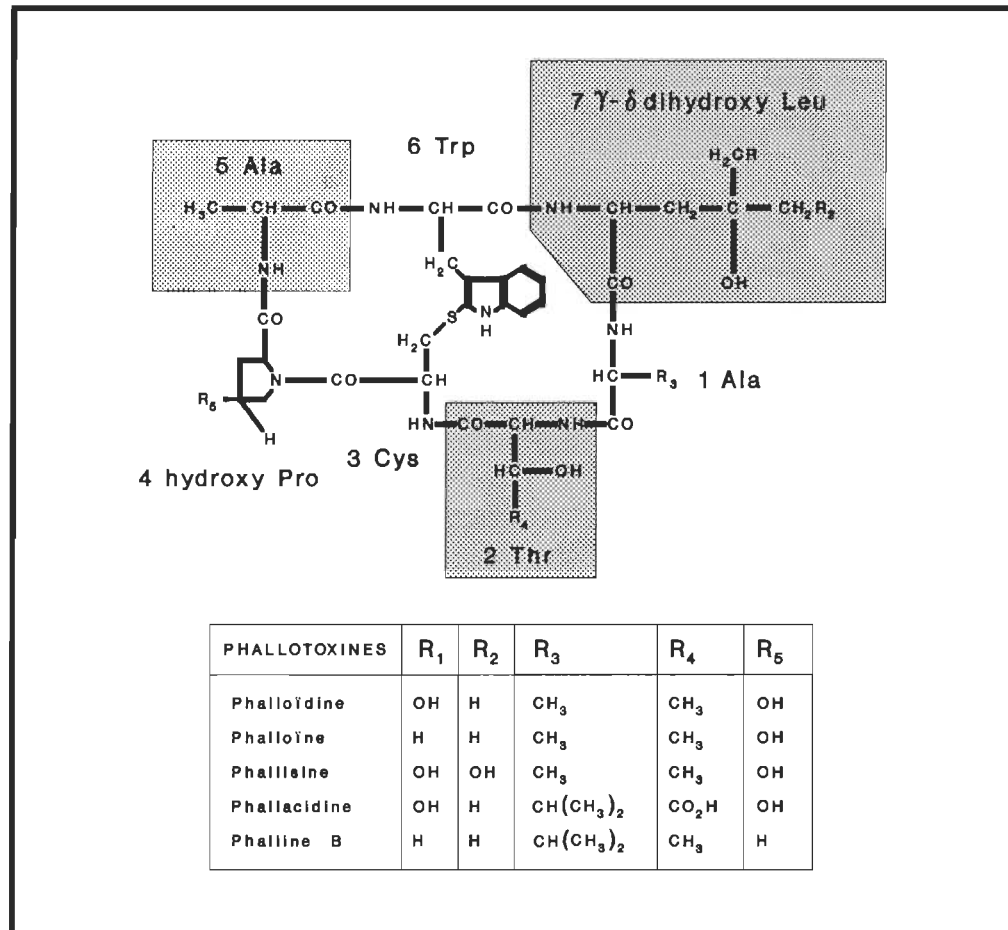
La structure du filament illustrée à la figure 3 est semblable à deux brins torsadés formant une double hélice, le pas de l'hélice est de 37.5 nm et contient 13 monomères distant de 5.5 nm (Korn E., 1982). Les monomères à l'intérieur du filament interagissent entre eux par des liens hydrophobes et quelques ponts salins semblent possibles (Holmes K.C. *et al*, 1990).

Le phénomène de polymérisation est dans une certaine mesure réversible. Plusieurs facteurs interviennent et modifient l'équilibre entre la forme globulaire et la forme filamenteuse de l'actine. La présence de cations est un des facteurs prédominants. D'autres facteurs peuvent aussi intervenir tel la concentration d'actine, la température, le type de solvant etc... Kasai, M. *et al*, (1962) ont montré qu'au-delà d'une concentration critique, la forme filamenteuse est favorisée. Ces mêmes auteurs ont montré que l'augmentation de température diminue cette concentration critique (du moins sur une plage de température de 0°C à 20°C). La transition globulaire à la forme filamenteuse est donc endothermique. A température plus élevée, la concentration critique ne sera pas affectée de la même façon car l'actine peut se dénaturer. Des études semblables ont été effectuées sur la flagelline, une protéine qui, comme l'actine, polymérise. Ces études ont montré que dans le cas de la flagelline, la vitesse de polymérisation maximale est atteinte aux environs de 25-27°C (Oosawa, F. et Asakura, S., 1975). Un comportement similaire peut être envisagé pour l'actine F bien qu'il ne semble pas avoir été vérifié.

## 2.22 Phalloïdine

La phalloïdine est un des six heptapeptides bicycliques de la classe des phallotoxines. Son poids moléculaire est de 789 Da. La figure 5 schématise la structure moléculaire du groupe des phallotoxines. Ces toxines proviennent de champignons mortels tels l'amanite phalloïde et l'amanite vireuse. La structure bicyclique confère à la phalloïdine une configuration assez rigide plus

particulièrement dans la région Trp 6 et Cys 3. Cette région est essentielle à la toxicité de la phalloïdine (Kessler, H. et Wein, T., 1991). L'action toxique de la phalloïdine se situe au niveau des hépatocytes. Elle provoque une polymérisation massive de l'actine des hépatocytes ce qui entraîne une altération des fonctions hépatiques (Wieland, Th., 1986).



**Figure 5:** Principales phallotoxines provenant d'amanites.

Cette propriété qu'a la phalloïdine de se lier à l'actine a permis de créer des outils d'études qui ont contribué à élucider certains aspects fondamentaux de la polymérisation de l'actine (Cooper, J., 1987). L'utilisation de la phalloïdine liée à la rhodamine comme marqueur fluorescent a permis de mettre en évidence la

présence de filaments d'actine dans des cellules (Wieland, Th., 1986). La phalloïdine a été aussi utilisée pour stabiliser la forme filamenteuse lors de l'étude cristallographique du filament d'actine (Holmes, K. *et al*, 1990).

### 2.23 Interaction entre l'actine et la phalloïdine

L'action toxique de la phalloïdine est due en grande partie à sa capacité de se lier à l'actine. La phalloïdine va se fixer plus spécifiquement à l'actine filamenteuse (actine F) et ce, entre ses deux domaines, près du site ATP (Hegyi, G. *et al*, 1986). Par contre, la phalloïdine ne se fixe pas sur l'actine G. Selon Thelestam, M. et Gross, R. (1990), cette spécificité pour l'actine F indiquerait que certaines régions entre les deux sous-unités ou domaines deviennent plus accessibles à la phalloïdine suite au changement de conformation des monomères d'actine induit par la polymérisation (de la forme G à la forme F). Selon ces mêmes auteurs, les rapports molaires de l'interaction entre la phalloïdine et l'actine seraient de l'ordre de l'unité. Cependant, Miyamoto, Y. *et al* (1986) mentionnent un rapport molaire phalloïdine:actine de 1:2. Cette interaction entre l'actine et la phalloïdine, en plus de diminuer la concentration critique de l'actine, réduit de beaucoup la vitesse de dissociation du filament en monomères (Sampath, P. et Pollard, T.D., 1991; Wendel, H. et Dancker, P., 1986). Cette stabilisation protège le filament d'actine contre le clivage protéolytique (Pollender, J. et Gruda, J., 1979; De Vries, I et Wieland, Th., 1978), contre la dépolymérisation aux ultra-sons (Dancker, P. *et al*, 1975), la DNase I (Schäfer, A. *et al*, 1975), la cytochalasine B (Löw, I. *et al*, 1975) ainsi que contre la dénaturation thermique (De Vries, I. *et al*, 1976; Le Bihan, T. et Gicquaud, C., 1991). Les mécanismes d'interactions entre la phalloïdine et l'actine ne sont pas clairement définis mais il semble que cette interaction ( $K_d=10^{-8}M$ ) ne soit pas covalente (Thelestam, M. et Gross, R., 1990).

## 2.3 Études antérieures de la dénaturation thermique de l'actine

Les premières études de dénaturation thermique de l'actine ont commencé au début des années 70. De nombreux résultats ont été obtenus, mais sont très variables, ce qui laisse place à de nombreuses interprétations.

### 2.31 Revue de la littérature

La dénaturation thermique de l'actine a surtout été étudiée avec l'actine G. Peu de travaux ont été effectués sur l'actine F. La plupart des auteurs qui ont étudié la dénaturation thermique de l'actine s'entendent pour dire que cette dénaturation est irréversible (Lehrer, S. et Kerwar, G., 1972; Kuznetsova, I.M. *et al*, 1988; Bertazzon, A. *et al*, 1990; Ikeuchi, Y. *et al*, 1990); par contre C.C. Contaxis *et al* (1977) ont montré que l'actine G peut se dénaturer de façon réversible. Basé sur cette étude de C.C. Contaxis, certains auteurs (Tatunashvili, L.V. et Privalov, P.L., 1984; Bertazzon, A. *et al*, 1990) admettent que la dénaturation thermique de l'actine peut, dans certaines conditions, se décrire par des paramètres purement thermodynamiques. La réversibilité de la dénaturation de l'actine G est toutefois sévèrement critiquée par Kuznetsova, I.M. *et al* (1988).

La majorité des auteurs s'entendent pour dire que l'actine G se dénature partiellement mais de façon irréversible lorsqu'elle est chauffée à haute température. Ce même état partiellement dénaturé peut également être obtenu si on retire le cation divalent ( $\text{Ca}^{+2}$ ) de l'actine (Bertazzon, A. *et al*, 1990). L'état complètement dénaturé ou déployé peut être obtenu, sans apport calorifique, en présence de chlorure de guanidium ou d'urée (Bertazzon, A. *et al*, 1990; Lehrer, S. et Kerwar, G., 1972).

Les chercheurs qui se sont penchés plus en détail sur les mécanismes de dénaturation affirment que la dénaturation thermique de l'actine G n'obéit pas à un mode de dénaturation binaire réversible (Tatunashvili, L.V. et Privalov, P.L., 1984; Bertazzon, A. *et al*, 1990;) mais ils ont considéré malgré tout que cette transition peut être décrite par des paramètres purement thermodynamiques. L.V. Tatunashvili et Privalov, P.L. (1984) prétendent que l'actine G est composée de deux sous-unités ou domaines interagissant entre eux tandis que A. Bertazzon *et al* (1990) considèrent plutôt deux sous-unités non-interactives qui se dénaturent de façon indépendante. Le tableau 2 présente, en ordre chronologique, une synthèse de ces différents points de vue.

Les plus grandes divergences se situent surtout au niveau de l'évaluation des

températures de transition qui sont présentées au tableau 3. Ces études ont toutes été effectuées par calorimétrie différentielle à balayage (D.S.C.). Certaines recherches effectuées par spectrofluorométrie sont arrivées à la conclusion que l'actine G n'aurait pas de température de transition (Lehrer, S. et Kerwar, G., 1972). Ce dernier point, bien que surprenant, peut être l'indice que certaines lois cinétiques puissent intervenir dans la dénaturation thermique de l'actine G.

**Tableau 2**

Bref historique de l'étude de la dénaturation thermique de l'actine G

Auteurs	Commentaires
Lehrer, S.S. et Kerwar, G. (1972)	-Montre par variation d'intensité de fluorescence que l'actine G n'a pas une $T_m$ définie.
Contaxis, C.C. <i>et al</i> (1977)	-L'actine G se dénature de façon réversible (étude par C.D. et U.V.). $T_m = 57.1^\circ\text{C}$ ; $v$ non précisée.
Fausnaugh, J.L. <i>et al</i> (1984)	-Étude par D.S.C., $T_m = 80^\circ\text{C}$ ; $v = 600^\circ\text{C/h}$ .
Tatunashvili, L.V. et Privalov P.L. (1984)	-Étude par D.S.C., $T_m = 66^\circ\text{C}$ ; $v = 120^\circ\text{C/h}$ . Montre que l'actine ne se dénature pas selon le modèle de dénaturation réversible en deux étapes. Suggère que les deux sous-unités interagissent entre elles.
Kuznetsova I.M. <i>et al</i> (1988)	-Étude par variation d'intensité de fluorescence. Montrent que la dénaturation est irréversible, $T_m = 58-59^\circ\text{C}$ ; $v$ inconnue. Contredit les travaux de Contaxis C.C. <i>et al</i> (1977).
Bertazzon, A. <i>et al</i> (1990)	-Montre l'irréversibilité de la dénaturation de l'actine G, mais considère une approche thermodynamique. $T_m = 57.2^\circ\text{C}$ , $v = 30^\circ\text{C/h}$ . L'actine est composée de sous-unités qui se dénaturent de façon indépendante.

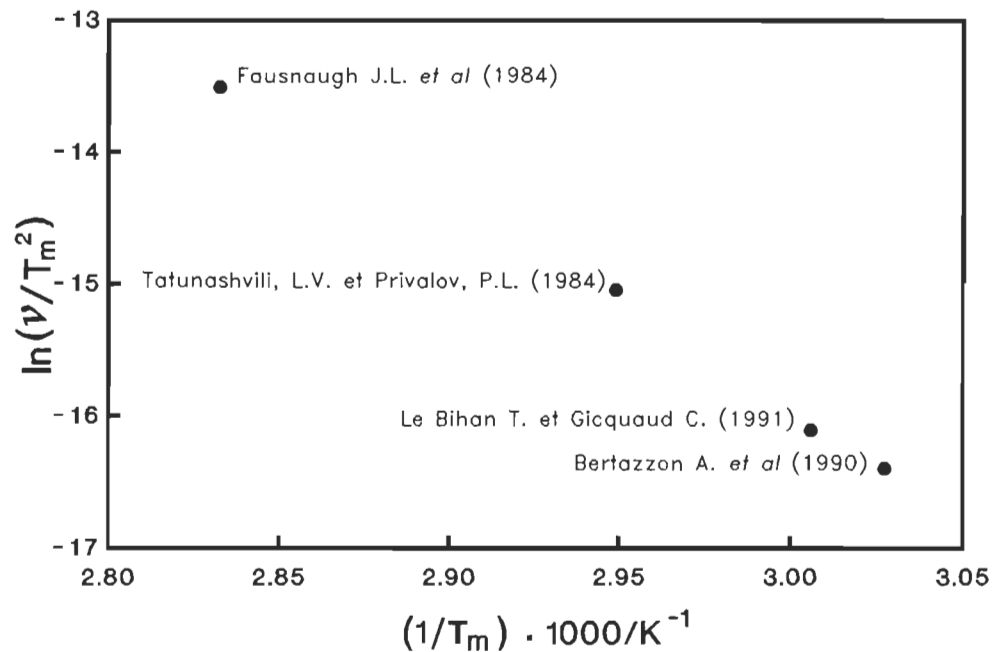


L'approche thermodynamique ne peut expliquer les variations de la température de transition de l'actine G (de 57 à 80°C au tableau 3). Une approche cinétique, utilisant l'équation [16], associe la température de transition à la vitesse de balayage. Cette relation, montrée à la figure 6 dans un espace graphique  $\ln(\nu/T_m^2)$  vs  $1/T_m$ , est typique des phénomènes irréversibles sous dépendance de paramètres cinétiques.

**Tableau 3**

Températures de transitions de l'actine G obtenues par différents auteurs

Auteurs	$T_m$ (°C)	vitesse de balayage ( $\nu$ ) (°C/h)
Bertazzon, A. <i>et al</i> (1990)	57.2	30
Le Bihan T. et Gicquaud, C. (1991)	59.5	40
Tatunashvili L.V. et Privalov, P.L. (1984)	66	120
Fausnaugh J.L. <i>et al</i> (1984)	80	600



**Figure 6:** Relation, selon l'équation [16], entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine G et la vitesse de balayage ( $\nu$ ). Les paramètres de base, provenant de différents auteurs, sont présentés au tableau 3.

Les études de dénaturation thermique de l'actine F sont peu nombreuses (Sano, T. *et al* 1989; Ikeuchi, Y. *et al*, 1981; Bertazzon, A. *et al*, 1990; Le Bihan T. et Gicquaud, C., 1991). Les auteurs s'accordent sur le fait que la structure filamenteuse confère une plus grande thermostabilité à l'actine F (Bertazzon, A. *et al*, 1990; Le Bihan, T. et Gicquaud, C., 1991). L'application de lois cinétiques à la dénaturation thermique de l'actine F a été considérée par Y. Ikeuchi *et al* (1981).

Les travaux de A. Bertazzon *et al* (1990) sont les plus récents et les plus approfondis et méritent d'être analysés en détail.

### 2.32 Analyse critique du modèle de Bertazzon

L'étude de Bertazzon, A. *et al* (1990) sur la dénaturation thermique de l'actine mérite une attention particulière car elle est très récente et c'est une des rares études qui tente de quantifier la dénaturation thermique de l'actine G. L'analyse que nous présentons est basée sur l'article de ces auteurs paru dans la revue *Biochemistry* **29**, 291-298 (1990).

Les auteurs ont tout d'abord étudié la dénaturation thermique de l'actine G. Les paramètres thermodynamiques utilisés sont présentés au tableau 4. Un rapport de coopérativité de 0.7 a été mesuré et ce rapport est associé à l'indépendance de la dénaturation des deux sous-unités de l'actine.

**Tableau 4**

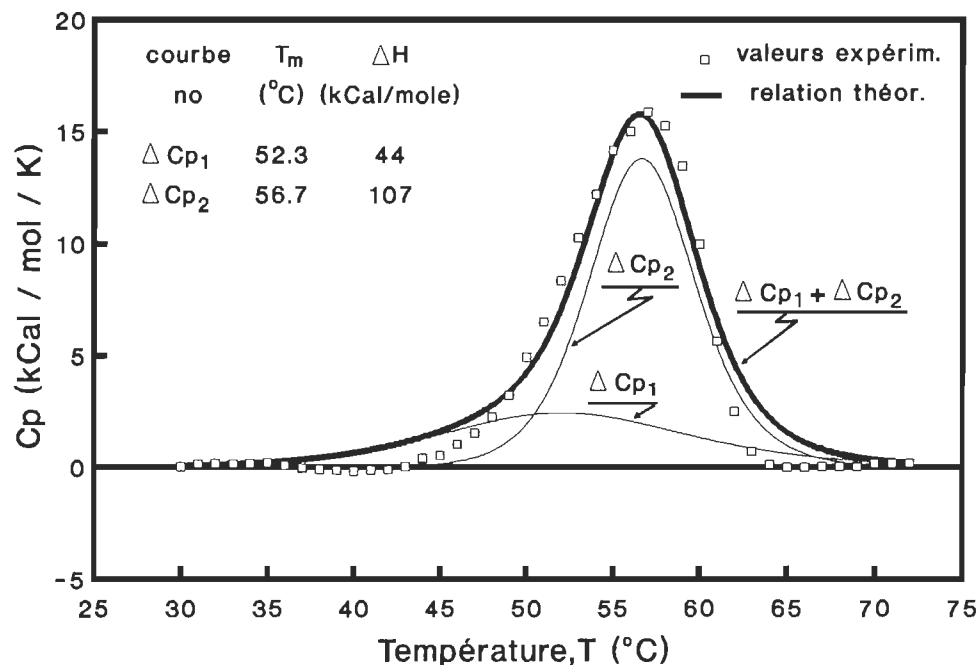
Paramètres thermodynamiques de la dénaturation thermique de l'actine utilisés par Bertazzon, A. *et al*, 1990.

	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ kCal/mole <sup>1</sup>
<i>Actine G</i>		
transition 1	52.3	44
transition 2	56.7	107
<i>Actine F</i>		
transition unique	67.2	180

1 Les unités de l'enthalpie molaire sont les unités utilisées par les auteurs  
(1 calorie = 4.18 joules)

Les auteurs considèrent que les variations d'enthalpies associées à la dénaturation de chaque sous-unité sont directement proportionnelles au poids moléculaire de chacune de ces sous-unités, selon l'ordre de grandeur des poids moléculaires proposés par Jacobson G.R. et Rosenbush, J.P. (1976). Bertazzon, A. *et al*, considérant que la grande sous-unité est au moins deux fois plus grosse que la petite sous-unité, associent une enthalpie de dénaturation de 44 kCal/mole à la petite sous-unité et une enthalpie de 107 kCal/mole à la grosse sous-unité.

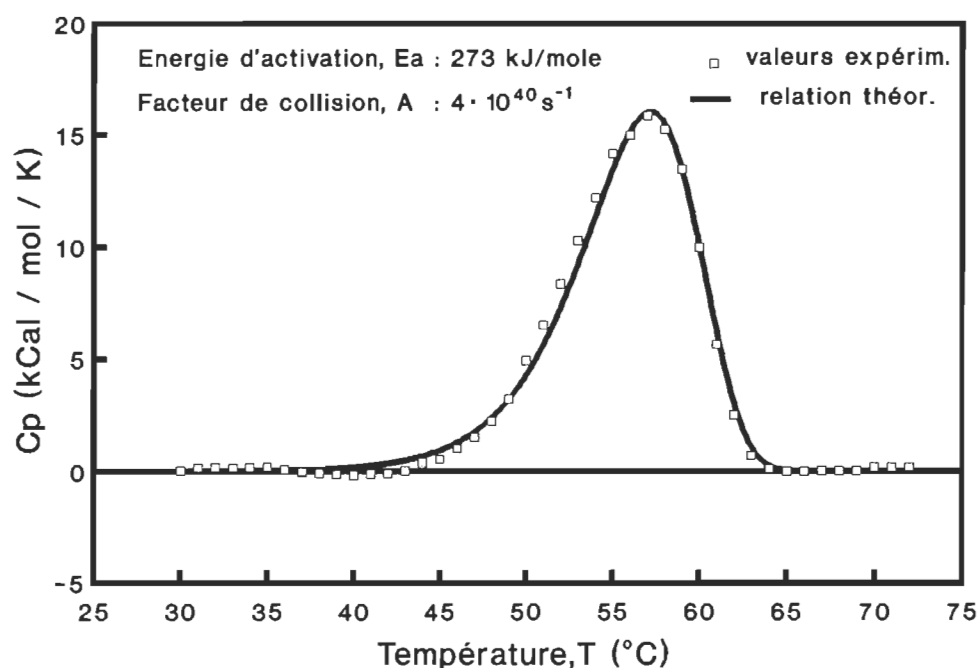
La figure 7 montre les résultats expérimentaux et les régressions obtenues par les auteurs en utilisant les paramètres du tableau 4 dans l'équation [9]. L'écart entre les courbes  $\Delta C_{p1}$  et  $\Delta C_{p2}$  est directement associé à l'hypothèse d'indépendance des deux sous-unité et aux poids moléculaires attribués à chaque sous-unité. La courbe théorique cumulée ( $\Delta C_{p1} + \Delta C_{p2}$ ) reproduit fidèlement le tracé expérimental au voisinage des températures de transition mais s'en écarte légèrement pour des températures inférieures à 50°C et supérieures à 60°C.



**Figure 7:** Tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine G obtenu par A. Bertazzon *et al* (1990) et interprétation thermodynamique du phénomène selon ces auteurs. Les paramètres indiqués sur la figure, fournissent par l'équation [9], les valeurs de  $\Delta C_{p1}$  et  $\Delta C_{p2}$  illustrés graphiquement.

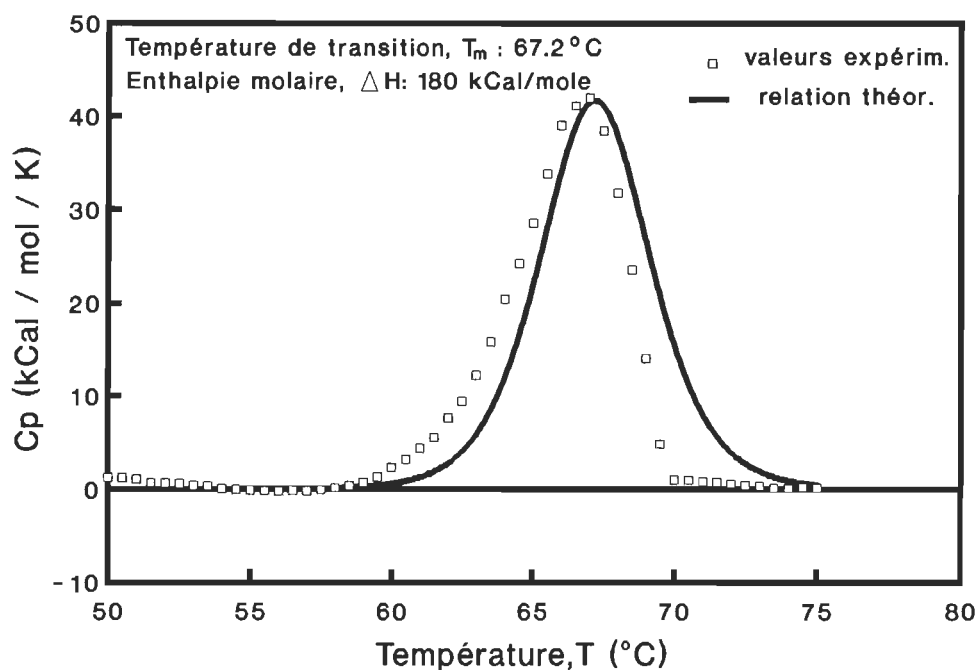
Les travaux de W. Kabsch *et al* (1990) ont montré depuis, que les poids moléculaires proposés par Jacobson G.R. et Rosenbush, J.P. (1976) et utilisés par Bertazzon, surestiment la différence entre les deux sous-unités; l'analyse structurale poussée au niveau atomique ne montre en fait que très peu de différence entre les tailles de ces sous-unités. Si cette observation n'infirme pas complètement les hypothèses de base de la théorie de la dénaturation indépendante des sous-unités, elle remet en question la répartition de l'enthalpie sur la base de leur poids moléculaire.

L'approche cinétique de Conejero-Lara F. *et al* (1991), appliquée aux données de Bertazzon permet d'obtenir, sans hypothèse contraignante, une reproduction assez fidèle du tracé calorimétrique. La figure 8 compare la solution numérique de l'équation [13] aux résultats expérimentaux de Bertazzon. Les paramètres cinétiques ont été obtenus par la relation d'Arrhénius et  $k_{app}$  a été évalué selon l'équation [15] en utilisant la vitesse de balayage mentionnée par Bertazzon, soit: 30°C/h. L'asymétrie du tracé est parfaitement respectée sans faire intervenir l'hypothèse de l'indépendance de la dénaturation des deux sous-unités.



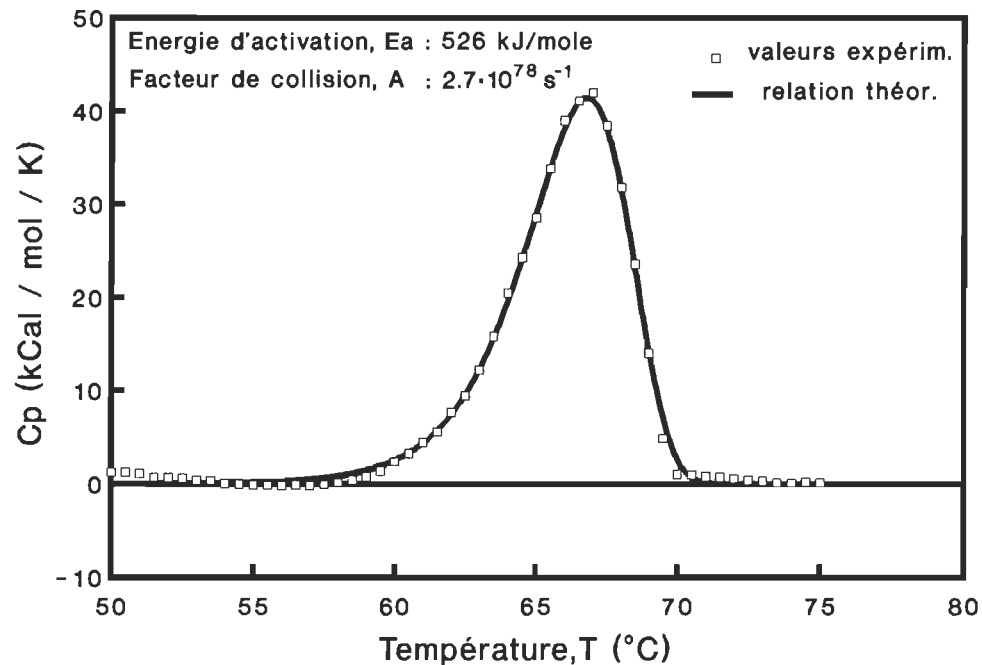
**Figure 8:** Interprétation cinétique du tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine G obtenu par A. Bertazzon *et al* (1990). Interprétation selon l'équation [13]. Les paramètres cinétiques sont obtenus d'une relation d'Arrhénius,  $k_{app}$  est calculée selon l'équation [15].

Bertazzon, A. *et al* (1990) ont également tenté une approche thermodynamique de la dénaturation de l'actine F présentée en figure 9. Les auteurs ont utilisé l'équation [9] dont les hypothèses implicites sont celles du modèle binaire réversible. La courbe théorique ne peut reproduire l'asymétrie des données expérimentales, car dans le modèle de Bertazzon, cette asymétrie est associée à l'indépendance de la dénaturation des sous-unités (indépendance non applicable à l'actine F).



**Figure 9:** Tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine F obtenu par A. Bertazzon *et al* (1990) et interprétation thermodynamique du phénomène selon ces auteurs. La courbe en continue est obtenue par l'équation [9] et représente une transition réversible entre deux états.

L'application du modèle cinétique aux données de Bertazzon obtenues sur l'actine F est montrée à la figure 10. La concordance entre la solution numérique de l'équation [13] et les données expérimentales est quasi parfaite et l'asymétrie est totalement respectée.



**Figure 10:** Interprétation cinétique du tracé calorimétrique associé à la transition thermique de l'actine F obtenu par A. Bertazzon *et al* (1990). Interprétation selon l'équation [13]. Les paramètres cinétiques sont obtenus d'une relation d'Arrhénius,  $k_{app}$  est évalué selon l'équation [15].

L'utilisation de lois cinétiques pour la description de la dénaturation thermique de l'actine G et F peut expliquer des résultats à priori différents, et permet de mettre en évidence l'importance de certaines variables jusqu'ici négligées. La justesse de ces applications semble confirmer que la dénaturation thermique de l'actine G est sous dépendance cinétique et explique l'influence de la vitesse de balayage sur la température de transition mesurée en calorimétrie (influence montrée à la figure 6).

### 2.33 Dénaturation de l'actine en présence de phalloïdine

L'effet protecteur de la phalloïdine contre la dénaturation thermique de l'actine est souvent mentionné dans la littérature mais n'a fait l'objet que de très peu de recherches. De Vries, I. *et al* (1976) ont fait une description qualitative du phénomène en mesurant les différences de spectres d'absorbance de l'actine F en présence ou en absence de phalloïdine. Ces auteurs ont remarqué que l'actine F en présence de phalloïdine est protégée contre la dénaturation thermique à 70°C\*. Notre recherche bibliographique semble montrer que notre étude est une des rares recherches quantitatives (sinon la seule) sur ce sujet. Certains éléments de cette étude ont déjà été publiés (Le Bihan, T. et Gicquaud, C., 1991) et font l'objet d'une section particulière au chapitre 5 qui présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

---

\* Ces auteurs ont vérifié l'effet thermostabilisant de la phalloïdine sur l'actine F pour une période de 3 minutes.

### 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre se veut un reflet le plus fidèle possible de la méthodologie utilisée. Afin d'alléger et de faciliter la compréhension des protocoles expérimentaux, certains aspects particuliers seront présentés au chapitre 5 (résultats et discussion).

#### 3.1 Matériel biologique

Dans cette section, nous détaillons la méthode de préparation et la purification du matériel biologique utilisé. La préparation finale de chacun des échantillons dépend de chaque type d'essai et est donc abordée dans les sections pertinentes.

##### 3.11 Préparation de l'actine

L'actine du muscle strié de lapin a été purifiée à partir de la poudre acétonique selon la méthode de Pardee et Spudich (Pardee, J. et Spudich, J., 1982). L'actine a été maintenue dans le tampon suivant: Tris-HCl 2 mM, pH 8.0, ATP 0.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.2 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0.5 mM et azoture de sodium 0.02%. La concentration de l'actine G a été déterminée par spectroscopie d'absorption U.V. visible ( $E1\%_{290\text{ nm}} = 6.3$ ).

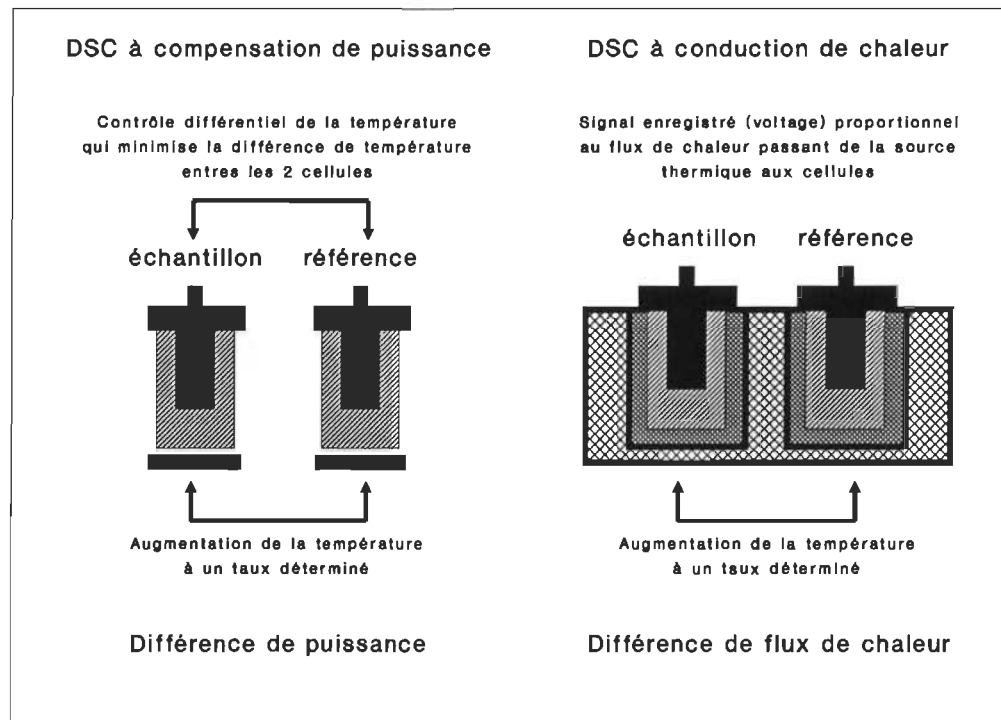
##### 3.12 Préparation de la phalloïdine

La phalloïdine a été extraite du champignon *Amanita virosa* et elle a été purifiée selon la méthode de Yocum (Yocum, R.R. et Simons, D.M., 1977) modifiée par Turcotte (Turcotte, A., 1982).

#### 3.2 Calorimétrie différentielle à balayage

Dans cette étude, deux types de calorimètres différentiels à balayage ont été utilisés: soit un calorimètre à compensation de puissance, ainsi qu'un calorimètre à conduction de chaleur. Le schéma de la figure 11 illustre le principe des deux types de calorimètres.





**Figure 11:** Principaux types de calorimètres différentiels à balayage.

**Le calorimètre à compensation de puissance** est un appareil qui a généralement deux cellules, une cellule échantillon qui contient la substance à étudier dans un tampon, et une cellule de référence qui ne contient que le tampon. Ce type d'appareil fonctionne à partir de deux boucles de rétroaction. La première boucle de rétroaction augmente la température de la cellule référence à une vitesse déterminée. La deuxième boucle minimise la différence de température entre les deux cellules en fournissant plus ou moins de puissance à la cellule échantillon. La différence de puissance reflète directement la différence de capacité calorifique entre les deux cellules selon la relation suivante:

$$\Delta C_p = \frac{\Delta P}{v} \quad [17]$$

- $\Delta C_p$  : variation de la capacité calorifique ( $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )  
 $\Delta P$  : différence de puissance entre les deux cellules ( $\mu\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 $v$  : vitesse de balayage ( $\text{K} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Le Microcal Mc-1 est un de ces types d'appareils. La principale qualité d'un tel appareil est qu'il possède un temps de réponse très faible (entre 15 et 45 s). Des temps de réponses élevés modifient les transitions thermiques mesurées qui doivent alors être corrigées à l'aide d'algorithmes complexes.

**Le calorimètre à conduction de chaleur** est un appareil de construction plus simple et peut donc être fabriqué à moindre frais (Ross, P. et Goldberg, R.N., 1974). Sa simplicité augmente de beaucoup sa versatilité, par exemple, il est possible de l'utiliser en mode isothermal ou en mode de titration calorimétrique (Bastos, M. *et al*, 1991). Les cellules échantillons et la cellule référence sont à l'intérieur d'un puits thermique, généralement un bloc de métal. La température de ce bloc augmente de façon linéaire en fonction du temps. Des senseurs thermiques, (thermopiles à multijonctions du type effet Peltier) isolent les cellules du puits thermique. La chaleur passant de la source thermique aux cellules, le fait à travers de ces senseurs thermiques. Le flux de chaleur passant du bloc de métal à une cellule est converti en signal analogique par les senseurs thermiques. Ce signal est associé à la capacité calorifique de la cellule d'intérêt par calibration. Le temps de réponse élevé (entre 120 et 180 s), oblige à interpréter le signal à l'aide d'algorithmes élaborés, afin de corriger la distorsion des données expérimentales.

### 3.21 Préparation des échantillons

Les solutions de travail les plus courantes sont présentées de façon succincte. L'actine globulaire a été maintenue dans le tampon suivant:

- Tampon G:
- Tris-HCl 2 mM, pH 8.0
  - ATP 0.2 mM
  - $\text{CaCl}_2$  0.2 mM
  - $\beta$ -mercaptoéthanol 0.5 mM
  - azoture de sodium 0.02%

La forme filamenteuse de l'actine a été obtenue par ajout d'un mélange de KCl et de  $\text{MgCl}_2$  pour obtenir une concentration finale de KCl à 100 mM et de  $\text{MgCl}_2$  à 2 mM.

Solution saline:    - 2.5 ml KCl 3 M  
                              - 1.5 ml  $\text{MgCl}_2$  0.1 M  
                              - 6 ml de tampon G

Pour l'étude de l'interaction entre la phalloïdine et l'actine, un tampon G deux fois plus concentré a été préparé.

La phalloïdine a été diluée dans de l'eau distillée jusqu'à une concentration de 0.66 mg/ml.

Le tableau 5 présente les solutions de travail utilisées lors de l'étude de l'effet de la phalloïdine sur la transition thermique de l'actine.

**Tableau 5**  
Solutions de travail

	Avec phalloïdine sln 1	Sans phalloïdine sln 2
Tampon G:	1.1 ml	1.1 ml
Tampon G 2X:	1 ml	1 ml
Solution saline:	1 ml	1 ml
Solution Ph/eau:	1 ml Ph	1 ml eau

Les solutions de travail ont été obtenues en mélangeant dans des proportions désirées les solutions sln 1 et sln 2 pour un volume total d'environ 2 ml. Ces solutions de phalloïdine ont été mélangées par la suite à une solution d'actine. Dans le cas de la préparation de solution d'actine G en présence de phalloïdine, on a remplacé le volume de solution saline par un volume égal de tampon G.

Pour les essais calorimétriques, les échantillons ont tous été dégazés. Le dégazage a été effectué avec la solution d'actine G. L'actine F était produite par polymérisation de l'actine G dans des solutions salines également dégazées. Les solutions d'actine F se sont révélées trop visqueuses pour un dégazage simple et efficace. Dans le cas de l'actine F, une attente minimum de 20 min a été respectée

pour permettre la polymérisation complète, avant l'essai proprement dit. Les échantillons ont été dégazés pendant 3 à 5 minutes. Les pertes dues à l'évaporation ont été contrôlées en comparant la masse des solutions avant et après dégazage. Généralement, la différence entre les deux pesées était négligeable, moins de 5% de la masse de solution.

Dans le cas de l'actine G, en plus du protocole général, une centrifugation supplémentaire de 2 heures à 40 000 rpm a permis d'éliminer d'éventuelles formes polymérisées ou dénaturées.

### 3.22 Utilisation du calorimètre Microcal Mc-1

Les volumes utilisés ont été de 0.918 ml de solution d'actine pour une concentration d'environ 3 mg/ml. La vitesse de balayage a été de 40°C/h pour tous les essais réalisés avec ce type d'appareil. Les données calorimétriques ont été obtenues par un tracé graphique de la variation de capacité calorifique ( $\Delta C_p$ ) vs la température (T). L'intégration de la surface sous la courbe a été effectuée par découpage et pesée du tracé de la transition sur papier. La ligne de base des tracés consistait dans ce cas, en une ligne droite reliant une température initiale et une température finale de transition, déterminées visuellement.

### 3.23 Utilisation du calorimètre Hart 7707

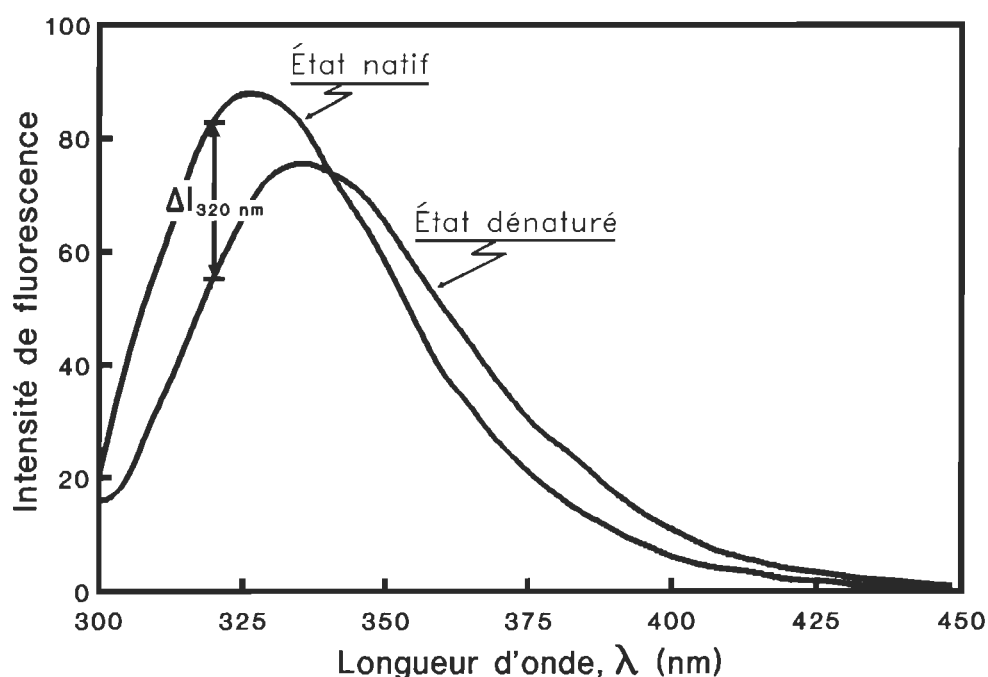
Trois échantillons pouvaient être étudiés simultanément, la base de référence a été obtenue par essais sur le tampon correspondant à chaque échantillon. La masse des solutions, mesurée était de l'ordre de  $0.50 \pm 0.001$  g. Tous les thermogrammes ont été corrigés pour l'effet du temps de réponse de l'appareil selon la méthode de Tian (Schwarz, F.P., 1989).

## **3.3 Variation d'intensité de fluorescence**

La méthode utilisée est propre à notre étude et certaines adaptations ou contraintes sont spécifiques au matériel biologique utilisé. La variation d'intensité de fluorescence intrinsèque a été utilisée pour quantifier l'effet du temps sur la

dénaturation thermique de l'actine. Les protocoles de préparation sont spécifiques à chaque type d'actine et sont présentés dans les sections suivantes. Tous les essais ont été effectués avec un spectrofluorimètre Shimazu RF-540.

Le spectre d'intensité de fluorescence intrinsèque de l'actine G, tel qu'illustré à la figure 12, est modifié lorsque l'actine est dénaturée (Kuznetsova, I.M. *et al*, 1988). Le déplacement du pic d'émission de fluorescence vers de plus grandes longueurs d'onde associé à la dénaturation thermique de l'actine permet de suivre l'évolution de la dénaturation thermique à 320 nm, pour une excitation à 294 nm. Dans notre étude, cette transformation a toujours été irréversible même au-delà de 2 jours.



**Figure 12:** Spectre d'intensité de fluorescence intrinsèque de l'actine G native et dénaturée.

### 3.31 Préparation des échantillons d'actine G

L'actine a été diluée dans le tampon G et distribuée dans une quinzaine de tubes en verre scellés pour en réduire l'évaporation. Les tubes ont été immergés dans un bain thermostaté (l'équilibre thermique des solutions a toujours été atteint

en l'espace de quelques secondes). Par la suite, ces tubes ont été retirés à des temps prédéterminés et immergés dans un mélange d'eau et de glace. La mesure d'intensité de fluorescence a été effectuée à 320 nm pour une excitation à 294 nm et à la température fixe de 25°C. Les concentrations d'actine utilisées correspondaient à une plage à l'intérieur de laquelle l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'actine (environ de 0.02 à 0.1 mg/ml). Pour de plus fortes concentrations d'actine, un certain volume d'actine G concentrée a été prélevé, à des temps déterminés. Ce volume d'actine a été dilué 1:100 dans le tampon G avant d'en effectuer la mesure de variation d'intensité de fluorescence.

### 3.32 Préparation des échantillons d'actine F

La mesure de la dénaturation thermique de l'actine F est plus complexe, car la dénaturation de cette forme d'actine produit des agrégats qui ne permettent plus l'utilisation directe des méthodes optiques. L'absence de précédent et certaines particularités de notre recherche nous ont obligé à développer notre propre protocole.

On admet ici que l'actine F lorsqu'elle se dénature produit des agrégats qui interagissent probablement entre eux mais n'ont pas d'interaction avec l'actine F native encore en solution. La procédure adoptée était la suivante:

- Préparation de 50 ml d'actine F à une concentration de 0.29 mg/ml.
- Polymérisation de l'actine pendant 45 minutes à température ambiante.
- Distribution de 1 ml d'actine F dans 12 groupes de 3 éprouvettes.
- Immersion des éprouvettes dans un bain thermostaté à température fixe, T, durant un temps prédéterminé, t.
- Immersion des éprouvettes, dans un mélange d'eau et de glace.
- Prélèvement d'un volume de 0.15 ml dans chaque éprouvette et dilution avec 2.85 ml de tampon G (tube à ultracentrifugeuse).
- Dépolymérisation durant une période de 12 à 18 heures au réfrigérateur.
- Centrifugation d'une heure à 40 000 rpm pour séparer les agrégats d'actine dénaturée et d'actine native.

La mesure de l'intensité de la fluorescence est effectuée à 324 nm avec une

excitation à 294 nm. Cette mesure est obtenue de la valeur moyenne du signal d'intensité de fluorescence de trois échantillons immergés à la même température (T) durant un même temps (t).

## 4 ANALYSE THÉORIQUE DE LA TRANSITION THERMIQUE

Dans ce chapitre, nous présentons les principales équations qui ont dû être développées pour interpréter, selon une approche cinétique, les résultats obtenus. L'approche utilise la notion d'ordre de réaction, concept courant en cinétique classique. Toutefois la signification de l'ordre de réaction en dénaturation thermique n'est pas clairement établie et cet ordre est d'avantage utilisé comme facteur de forme que comme concept fondamental. Les équations originales ont été développées dans ce chapitre, tandis que les équations provenant d'autres publications sont admises à priori.

### 4.1 Calorimétrie différentielle à balayage

Nous avons développé des équations permettant d'exprimer l'effet de certaines variables sur la dépendance de la variation de capacité calorifique envers la température. Les principales variables considérées sont la vitesse de balayage et la concentration. Nous nous sommes limités à deux types de phénomènes cinétiques de dénaturation irréversible soit:

- pour un ordre de dénaturation égal à l'unité,
- pour un ordre de dénaturation différent de l'unité.

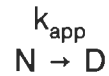
Après avoir obtenu les équations permettant de bien simuler les différents types de dénaturation irréversible, nous avons développé une façon simple d'obtenir des paramètres cinétiques à partir de données expérimentales.

#### 4.11 Simulation de thermogramme

Cette partie consiste en la simulation de transitions irréversibles obéissant à des lois simples, soit la dépendance de la variation de la capacité calorifique envers la température pour une vitesse de balayage constante ( $K \cdot s^{-1}$ ).



i) *Ordre de la dénaturation*  $n = 1$



$k_{app}$  : constante de vitesse ( $s^{-1}$ )

L'approche mathématique envisagée est semblable à celle de J.M. Sanchez-Ruiz *et al* (1988) et de M. Arnold *et al* (1979) bien que l'expression finale soit différente.

Les hypothèses de bases sont les suivantes:

- 1- Réaction d'ordre 1.
- 2- Dépendance de la constante de vitesse envers la température selon une loi d'Arrhénius.

La constante de vitesse se définit selon l'hypothèse 2 comme obéissant à la loi d'Arrhénius, équation [12]:

$$k_{app}(T) = A \cdot \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

A : facteur de collision ( $s^{-1}$ )  
 $E_a$  : énergie d'activation ( $kJ \cdot mole^{-1}$ )  
 $R$  : constante des gaz parfaits ( $0.008314 \text{ kJ} \cdot mole^{-1} \cdot K^{-1}$ )  
 $T$  : température (K)

L'équation classique de la cinétique

$$\frac{dN}{dt} = k_{app} \cdot N^n$$

s'exprime pour un ordre de réaction égal à l'unité et les variables utilisées par:

$$\frac{d(c\alpha)}{dt} = k_{app} \cdot f(\alpha) \quad [18]$$

$t$  : temps (s)  
 $\alpha$  : fraction de protéine ayant réagit

$f(\alpha)$  : fonction de  $\alpha$   
 $c$  : concentration de protéine ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

La fraction de protéine ayant réagi peut se définir comme:

$$\alpha = \frac{[N_o] - [N(t)]}{[N_o]} \quad [19]$$

$[N_o]$  : concentration initiale de la protéine ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )  
 $[N(t)]$  : concentration de la protéine dans l'état natif à un temps  $t$  ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Les conditions limites de  $\alpha$  sont les suivantes:

à  $t = 0$ ;  $\alpha = 0$

à  $t = \infty$ ;  $\alpha = 1$

En approche cinétique,  $f(\alpha)$  peut s'exprimer par:

$$f(\alpha) = (c - c\alpha)^n \quad [20]$$

$n$  : ordre de la réaction

L'ordre de la réaction étant de 1, l'équation [18] peut s'écrire:

$$\frac{cd\alpha}{dt} = k_{app} \cdot c(1 - \alpha) \quad [21]$$

Considérant que la température augmente de façon linéaire en fonction du temps (calorimétrie différentielle à balayage).

$$\frac{dT}{dt} = \nu \quad [22]$$

$\nu$  : vitesse de balayage ( $\text{K} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$$dT = \nu dt \quad [23]$$

Sachant que  $dT/dt$  correspond à la vitesse de balayage ( $\nu$ ) qui est admise constante

et en remplaçant la valeur de  $k_{app}$  de l'équation [21] par sa valeur provenant de la relation d'Arrhénius (équation [12]) on peut donc exprimer l'équation [21] sous la forme:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \cdot (1 - \alpha) \quad [24]$$

En séparant les variables, on obtient l'équation différentielle suivante:

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{1-\alpha} = \int_{T_i}^T \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \quad [25]$$

Dont la solution partielle permet d'isoler le terme  $(1-\alpha)$ :

$$\ln(1-\alpha) = \frac{-1}{v} \int_{T_i}^T A \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \quad [26]$$

$$(1-\alpha) = \exp\left(\frac{-1}{v} \int_{T_i}^T A \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT\right) \quad [27]$$

En introduisant cette expression de  $(1-\alpha)$  de l'équation [27] dans l'équation [24], on obtient:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \exp\left(\frac{-1}{v} \int_{T_i}^T A \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT\right) \quad [28]$$

En admettant l'hypothèse peu contraignante de P.L. Privalov (1979) que l'aire sous la courbe de la transition thermique obtenue par calorimétrie différentielle à balayage est proportionnelle à la quantité de protéine impliquée dans le processus, on peut concevoir la relation suivante entre la variation de la capacité calorifique,  $\Delta C_p$ , et  $d\alpha/dT$  (décrite également par l'équation [6]):

$$\Delta C_p = Q_T \frac{d\alpha}{dT} \quad [29]$$

$Q_T$  : quantité de chaleur totale impliquée dans le processus ( $\mu\text{J}$ )  
 $\Delta C_p$  : variation de la capacité calorifique ( $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )

On peut exprimer  $\Delta C_p$  à l'aide de paramètres cinétiques en substituant la valeur de  $d\alpha/dT$  de l'équation [29] son expression selon [28].

$$\Delta C_p = \frac{A Q_T}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \exp\left(\frac{-A}{v} \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) dT\right) \quad [30a]$$

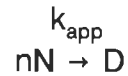
ou

$$\Delta C_p = \frac{A \eta \Delta H_{\text{cal}}}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \exp\left(\frac{-A}{v} \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) dT\right) \quad [30b]$$

L'équation [30a] a été présentée dans le chapitre 2: État des connaissances (équation [13]). Bien que produite par un cheminement différent, cette équation produit des résultats identiques à l'équation [14] proposée par Conejero-Lara F. *et al* (1991)

Les équations [30a] et [30b] ont été utilisées pour la simulation de tracés calorimétriques obéissant à un mécanisme d'ordre 1, en particulier les tracés calorimétriques de Bertazzon, A. *et al* (1990) présentés aux figures 8 et 10. L'intégrale d'Arrhénius ne peut être solutionnée que par méthode numérique. La valeur de la borne inférieure de l'intégrale,  $T_i$ , n'est vraiment pas critique car ce type de fonction (équation [30a] et [30b]) converge rapidement, pourvu que la valeur de  $T_i$  soit inférieure de 20-40 K à la température de transition.

ii) *Ordre de la dénaturation  $n \neq 1$*



Les hypothèses de bases sont légèrement différentes du cas précédent:

- 1- cinétique d'ordre  $n \neq 1$
- 2- dépendance de la constante de vitesse envers la température selon une loi d'Arrhénius

Il s'agit de résoudre l'équation [18] pour un l'ordre différent de 1 et une augmentation linéaire de la température en fonction du temps.

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_{app} (C - \alpha)^n \quad [31]$$

$$\frac{cd\alpha}{dT} = \frac{k_{app}}{v} (C - \alpha)^n \quad [32]$$

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{k_{app}}{v} C^{(n-1)} (1 - \alpha)^n \quad [33]$$

$k_{app}$  : constante de vitesse pour  $n \neq 1$   $((\text{mg/ml})^{(1-n)} \cdot \text{s}^{-1})$

Peu importe l'ordre  $n$ , le facteur de collision ( $A$ ) a les mêmes unités que la constante de vitesse c'est à dire des  $(\text{mg/ml})^{(1-n)} \cdot \text{s}^{-1}$ . Pour éclaircissement, voir l'équation [12].

En remplaçant la valeur de  $k_{app}$  de l'équation [12] et en séparant les variables, on obtient l'équation différentielle suivante:

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{(1-\alpha)^n} = \int_{T_i}^T \frac{Ac^{(n-1)}}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \quad [34]$$

Dont la solution partielle permet d'isoler le terme  $(1-\alpha)$ :

$$\frac{1-(1-\alpha)^{(1-n)}}{(1-n)} = \frac{Ac^{(n-1)}}{v} \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \quad [35]$$

$$(1-\alpha) = \left[ 1 - (1-n) \frac{Ac^{(n-1)}}{v} \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \right]^{\left(\frac{1}{1-n}\right)} \quad [36]$$

En utilisant cette expression de  $(1-\alpha)$  dans l'équation différentielle [33] on obtient:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{Ac^{(n-1)}}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \left[ 1 - (1-n) \frac{Ac^{(n-1)}}{v} \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \right]^{\left(\frac{n}{1-n}\right)} \quad [37]$$

On peut voir de cette équation [37] que le terme  $(d\alpha/dT)$  est affecté par des modifications de la concentration ( $c$ ) au même titre que par une modification du facteur de collision ( $A$ ). Des simulations numériques effectuées avec différentes valeurs de l'ordre  $n$ , ont montré que la relation entre  $\Delta C_p$  et  $d\alpha/dT$  exprimée avec l'équation [29] reste inchangée quelle que soit la concentration.

Pour alléger l'expression, les termes  $A$  et  $c^{(n-1)}$  ont été regroupés sous un même paramètre,  $\xi$ .

$$\xi = Ac^{(n-1)} \quad [38]$$

$\xi$  : facteur de collision pondéré pour une réaction d'ordre  $n$ , ( $s^{-1}$ )

Les équations [37] et [33] peuvent alors se réécrire de la façon suivante:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \left[ 1 - (1 - n) \frac{\xi}{v} \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \right]^{\left(\frac{n}{1-n}\right)} \quad [39]$$

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) (1-\alpha)^n \quad [40]$$

L'utilisation du facteur de collision pondéré ( $\xi$ ) simplifie le développement des équations et l'évaluation des paramètres cinétiques à partir de courbes expérimentales (méthode de régression présentée à l'item 4.12 ii).

$\Delta C_p$  s'exprime en fonction de paramètres cinétiques classiques en substituant dans l'équation [29] l'expression de  $d\alpha/dT$  de [39].

$$\Delta C_p = \frac{Q_T \xi}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \left[ 1 - (1 - n) \frac{\xi}{v} \cdot \int_{T_i}^T \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT \right]^{\left(\frac{n}{1-n}\right)} \quad [41]$$

La solution numérique de cette équation [41] a été utilisée pour simuler la relation entre  $\Delta C_p$  et  $T$  pour des paramètres cinétiques  $Ea$ ,  $\xi$  et  $n$  variables. On peut, bien entendu, remplacer la valeur de  $Q_T$  par  $\eta \Delta H_{cal}$  (équation [7]).

#### 4.12 Méthodes de régression

Cette partie consiste à évaluer les paramètres cinétiques à partir de courbes calorimétriques et ce, à l'aide d'une méthode de régression matricielle. Nous ne détaillerons pas la méthode qui est celle de J.M. Sanchez-Ruiz *et al* (1988). La méthode que nous présentons est plus générale et demeure assez simple permettant ainsi d'être utilisée à l'aide d'un chiffrier du genre QPRO, LOTUS, EXCEL etc...

La première étape à accomplir consiste à soustraire du thermogramme expérimental, la dépendance de la variation de la capacité calorifique envers la

température avant et après la transition thermique. Il n'y aura donc plus de dépendance entre la variation de la capacité calorifique et la température autre que la transition d'intérêt. La transition qui en résulte sera une valeur positive exprimée en unité de capacité calorifique.

L'étape suivante consiste à effectuer le quotient des valeurs de la variation de la capacité calorifique de la transition par  $Q_T$ . La courbe en résultant correspondra à  $d\alpha/dT$  selon l'équation [29]. La valeur de  $\alpha$  en fonction de la température sera évaluée en intégrant numériquement  $d\alpha/dT$  pour un intervalle  $dT$ . Selon l'ordre de la transition, on appliquera une des méthodes matricielles suivantes pour évaluer les paramètres cinétiques.

*i) Ordre de la dénaturation  $n = 1$*

Selon la méthode proposée, les valeurs de  $T$ ,  $d\alpha/dT$  et  $\alpha$  sont obtenues expérimentalement et les paramètres  $E_a$  et  $A$ , qui simulent le mieux une transition thermique irréversible, sont évalués par l'équation [24] .

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) (1 - \alpha)$$

On linéarise l'équation [24] dans l'intervalle  $[T_i, T_f]$  dont les bornes, définies à l'équation de base [7] seront optimisées selon la méthode décrite en section 4.13.

$$\ln\left(\frac{d\alpha}{dT}\right) = \ln\left(\frac{A}{v}\right) - \left(\frac{E_a}{R}\right)\frac{1}{T} + \ln(1 - \alpha) \quad [42]$$

On a donc à résoudre  $N = (T_f - T_i)/dT$  équations qui correspondent au nombre de points expérimentaux utilisés.



$$\ln\left(\frac{d\alpha_1}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_1) = \ln\left(\frac{A}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\frac{1}{T_1} \quad [43a]$$

$$\ln\left(\frac{d\alpha_2}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_2) = \ln\left(\frac{A}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\frac{1}{T_2} \quad [43b]$$

$$\ln\left(\frac{d\alpha_3}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_3) = \ln\left(\frac{A}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\frac{1}{T_3} \quad [43c]$$

$$\vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots$$

$$\ln\left(\frac{d\alpha_N}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_N) = \ln\left(\frac{A}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\frac{1}{T_N} \quad [43d]$$

Une fois linéarisé, on peut séparer les valeurs d'origine expérimentale:

$$\ln(d\alpha/dT), 1/T \text{ et } \ln(1-\alpha)$$

et les coefficients à évaluer:

$$\ln(A/v), -Ea/R$$

Il est alors possible d'exprimer ce système d'équations à l'aide d'une approche matricielle:

$$\begin{vmatrix} 1 & \frac{1}{T_1} \\ 1 & \frac{1}{T_2} \\ 1 & \frac{1}{T_3} \\ \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots \\ 1 & \frac{1}{T_N} \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} \ln\left(\frac{A}{v}\right) \\ -\frac{Ea}{R} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \ln\left(\frac{d\alpha_1}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_1) \\ \ln\left(\frac{d\alpha_2}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_2) \\ \ln\left(\frac{d\alpha_3}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_3) \\ \vdots \\ \vdots \\ \ln\left(\frac{d\alpha_N}{dT}\right) - \ln(1 - \alpha_N) \end{vmatrix} \quad [44]$$

$$|B_{ij}| * |S_j| = |Y_i|$$

C'est un système matriciel d'équations du genre  $B \cdot S = Y$  qui est incompatible (contient plus d'équations que d'inconnus) mais pouvant être simplement résolu à l'aide de la méthode des moindres carrés linéaire de la façon suivante (Leroux, P., 1983):

$$S = (B^T B)^{-1} B^T Y \quad [45]$$

- $B$  : matrice contenant les éléments 1 et  $1/T_N$   
 $Y$  : vecteur contenant les éléments  $\ln(d\alpha_N/dT) - \ln(1-\alpha_N)$   
 $S$  : vecteur solution ( $\ln(A/v)$  et  $-Ea/R$ )

Dans ce cas, il est souvent préférable d'éliminer les valeurs extrêmes souvent moins bien caractérisées mais ayant la même pondération que des valeurs plus significatives.

ii) *Ordre de la dénaturation  $n \neq 1$*

Selon les considérations précédentes, les paramètres suivants;  $T$ ,  $d\alpha/dT$ ,  $\alpha$  sont obtenus expérimentalement. Les paramètres  $Ea$ ,  $\xi$  et  $n$  qui simulent le mieux une transition thermique irréversible seront évalués à partir de l'équation [40].

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) (1-\alpha)^n$$

On linéarise l'équation [40] dans l'intervalle  $[T_i, T_f]$  dont les bornes, définies à l'équation de base [7] seront optimisées selon la méthode décrite en section 4.13.

$$\ln \frac{d\alpha}{dT} = \ln\left(\frac{\xi}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{RT}\right) + n \ln(1-\alpha) \quad [46]$$

On a donc à résoudre  $N = (T_f - T_i)/dT$  équations qui correspondent au nombre de points expérimentaux utilisés.

$$\ln\left(\frac{d\alpha_1}{dT}\right) = \ln\left(\frac{\xi}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\left(\frac{1}{T_1}\right) + n \ln(1-\alpha_1) \quad [47a]$$

$$\ln\left(\frac{d\alpha_2}{dT}\right) = \ln\left(\frac{\xi}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\left(\frac{1}{T_2}\right) + n \ln(1-\alpha_2) \quad [47b]$$

$$\ln\left(\frac{d\alpha_3}{dT}\right) = \ln\left(\frac{\xi}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\left(\frac{1}{T_3}\right) + n \ln(1-\alpha_3) \quad [47c]$$

$$\begin{array}{cccc} \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \ln\left(\frac{d\alpha_N}{dT}\right) & = & \ln\left(\frac{\xi}{v}\right) - \left(\frac{Ea}{R}\right)\left(\frac{1}{T_N}\right) + n \ln(1-\alpha_N) & [47d] \end{array}$$

Une fois linéarisé, on peut séparer les valeurs d'origine expérimentale:

$$\ln(d\alpha/dT), 1/T, \ln(1-\alpha)$$

et les coefficients à évaluer suivants:

$$\ln(\xi/v), -Ea/R, n$$

Il est alors possible d'exprimer ce système d'équation à l'aide d'une approche matricielle et de le résoudre de la même façon que mentionné dans le cas où  $n=1$ .

$$\begin{vmatrix} 1 & \frac{1}{T_1} & \ln(1-\alpha_1) \\ 1 & \frac{1}{T_2} & \ln(1-\alpha_2) \\ 1 & \frac{1}{T_3} & \ln(1-\alpha_3) \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & \frac{1}{T_N} & \ln(1-\alpha_N) \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} \ln\left(\frac{\xi}{v}\right) \\ -\frac{Ea}{R} \\ n \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \ln\left(\frac{d\alpha_1}{dT}\right) \\ \ln\left(\frac{d\alpha_2}{dT}\right) \\ \ln\left(\frac{d\alpha_3}{dT}\right) \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \ln\left(\frac{d\alpha_N}{dT}\right) \end{vmatrix} \quad [48]$$

$$|B_{ij}| * |S_j| = |Y_i|$$

#### 4.13 Évaluation de l'incertitude sur les coefficients

L'erreur sur les paramètres peut être évaluée à l'aide de la matrice de variance covariance (V) détaillée par Brown, A. (Brown, A., 1975):

$$V = \sigma_{\epsilon}^2 (B^T B)^{-1} \quad [49]$$

où l'estimateur  $\sigma_{\epsilon}^2$  se définit par:

$$\sigma_{\epsilon}^2 = \left[ \sum_{i=1}^N \left( \frac{\Delta C_{p_i \text{ exp}} - \Delta C_{p_i \text{ théor}}}{Q_T} \right)^2 \right] \frac{1}{N} \quad [50]$$

- $\Delta C_{p_i \text{ exp}}$  : valeurs de variation de capacité calorifique expérimentale ( $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
- $\Delta C_{p_i \text{ théor}}$  : valeurs de la capacité calorifique théorique ( $\mu\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
- $Q_T$  : quantité de chaleur impliquée dans tout le processus ( $\mu\text{J}$ )
- $N$  : nombre de données expérimentales utilisées pour la régression
- $\sigma_{\epsilon}^2$  : estimateur non biaisé de la variance

On retient les paramètres cinétiques correspondant à l'intégration numérique dans l'intervalle  $[T_i, T_f]$  qui fournit un estimateur  $\sigma_{\epsilon}^2$ , minimum. Un exemple d'application est présenté au chapitre 5, section 5.22.

De plus, les éléments  $v_{jj}$  de la diagonale principale de la matrice V, reflètent l'erreur-type des coefficients  $s_j$ , où  $s_j$  correspond à  $\ln(\xi/v)$  ou  $\ln(A/v)$ ,  $E_a/R$  et  $n$  selon la valeur de  $j$ . L'erreur-type sur le coefficient  $s_j$  ( $\Delta s_j$ ) se définit comme:

$$\Delta s_j = \sqrt{v_{jj}} \quad [51]$$

- $\Delta s_j$  : erreur type des coefficients  $s_j$
- $v_{jj}$  : élément de la diagonale principale de la matrice de variance covariance (V)

## **4.2 Analyse des résultats obtenus par fluorescence**

Pour analyser les résultats obtenus par fluorescence, il est important de déterminer l'ordre de la dénaturation thermique, et deux méthodes possibles ont été utilisées:

- 1- Relation entre le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) et la concentration de l'espèce.
- 2- Évaluation de l'ordre de la dénaturation ( $n$ ) à l'aide d'une seule courbe isothermale par une méthode de régression.

Après utilisation, la première méthode semble beaucoup plus sensible que la seconde. Une comparaison des deux méthodes est présentée au chapitre 5 présentant résultats et discussion.

La théorie concernant le traitement des données dans le cas de cinétique isothermale a été détaillée dans la littérature (Capellos, C. et Bielski, B.H.J., 1972). Pour ces raisons, nous ne présenterons que les équations finales utilisées dans cette étude.

### **4.21 Ordre 1**

Dans ce cas, lorsque l'ordre de la réaction est égal à l'unité ( $n=1$ ), il n'y a pas de relation entre le temps de demi-vie et la concentration (Capellos, C. et Bielski, B.H.J., 1972).

La relation entre la variation de la concentration d'une espèce donnée et le temps, obéit à une loi exponentielle. La relation entre l'intensité de fluorescence à 320 nm et le temps pour la dénaturation thermique de l'actine G, s'exprime par:

$$\Delta I_{320\text{nm}} = C + D \exp(-k_{\text{app}} t) \quad [52]$$

$t$  : temps (s)  
 $\Delta I_{320\text{nm}}$  : intensité de fluorescence  
 $C$  et  $D$  : paramètres de normalisation

Les termes  $C$  et  $D$  sont des paramètres de normalisation

pour  $t=0$ ,  $\Delta I_{320\text{nm}} = C + D$

pour  $t=\infty$ ,  $\Delta I_{320\text{nm}} = C$

Pour simplifier les comparaisons, on utilise, lorsque nécessaire, un facteur normalisé dont la valeur est comprise entre 0 ( $t=\infty$ ) et 1 ( $t=0$ ).

$$F_N(t) = \frac{(\Delta I_{320nm} \ C)}{D} \quad [53]$$

$F_N(t)$  : valeur normalisée de l'intensité de fluorescence à 320 nm au temps  $t$

D'autres aspects seront développés lors de la présentation des résultats au chapitre 5.

#### 4.22 Ordre $n$

$$nN \xrightarrow{k_{app}} D$$

Une des façons de mesurer l'ordre de la réaction est de vérifier l'effet de la concentration sur le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) (Capellos, C. et Bielski, B.H.J., 1972).

$$t_{1/2} = \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1)k_{app}[N]_o^{(n-1)}} \right] \quad [54]$$

$[N]_o$  : concentration de l'état natif à  $t=0$  ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$k_{app}$  : constante de vitesse pour des  $n \neq 1$  ( $(\text{mg/ml})^{(1-n)} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Cette équation est valide pour  $n \neq 1$ . A l'aide de l'équation [54], on constate que si  $n > 1$ , plus la concentration est élevée, plus le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) diminue et vice versa.

On peut évaluer l'ordre de la réaction avec un minimum de deux courbes de cinétique de dénaturation (courbe 1 et courbe 2) à des concentrations différentes (on a deux inconnus qui sont  $k_{app}$  et  $n$ ). On a donc deux relations  $t_{1/2}$  vs la concentration. On suppose que  $k_{app}$  est indépendant de la concentration pour une température donnée.

$$t_{1/2} = \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1)k_{app}[N_1]_o^{(n-1)}} \right] \quad [55a]$$

$$t_{2/2} = \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1)k_{app}[N_2]_o^{(n-1)}} \right] \quad [55b]$$

La valeur de  $k_{app}$  est isolée dans une des équations en fonction de  $n$  et de  $t_{2/2}$ .

$$k_{app} = \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1)t_{2/2}[N_2]_o^{(n-1)}} \right] \quad [56]$$

La valeur de  $k_{app}$  de l'équation [56] est remplacée dans l'équation [55a].

$$t_{1/2} - \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1) \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1)t_{2/2}[N_2]_o^{(n-1)}} \right] [N_1]_o^{(n-1)}} \right] = 0 \quad [57]$$

Une fois simplifiée, l'équation [57] donne:

$$(n-1) = \frac{\ln \left( \frac{t_{1/2}}{t_{2/2}} \right)}{\ln \left( \frac{[N_2]_o}{[N_1]_o} \right)} = \frac{-\Delta \ln(t_{1/2})}{\Delta \ln[N]_o} \quad [58]$$

Avec un minimum de deux courbes de dénaturation thermique à concentrations différentes et effectuées à la même température, donc avec la même valeur de  $k_{app}$ , on peut déduire l'ordre de la dénaturation à l'aide de l'équation [58]. Un graphique de  $\ln(t_{1/2})$  vs  $\ln([N]_o)$  fournit une droite dont la pente est de  $1-n$ . Laidler, K.L. (1950) obtient une relation similaire à l'équation [58] quoique cet auteur ne mentionne



aucunement de relation linéaire entre  $\ln(t_{1/2})$  vs  $\ln([N]_o)$ .

Une autre méthode pour évaluer l'ordre de la dénaturation consiste à utiliser une méthode de régression permettant d'évaluer  $k_{app}$  et  $n$  à l'aide de l'équation [59] qui est la relation cinétique de base entre la concentration de l'état natif et le temps pour un  $n$  différent de l'unité:

$$\Delta I_{324nm} = f [ [N]_o^{(1-n)} - (1-n)k_{app}t ]^{\left(\frac{1}{1-n}\right)} \quad [59]$$

$\Delta I_{324nm}$  : intensité de fluorescence normalisée

$f$  : facteur permettant la relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration

On dispose donc de deux méthodes pour évaluer l'ordre de la dénaturation thermique soit à l'aide de la méthode des moindres carrés non linéaires (équation [59]) soit à l'aide de la relation entre la concentration et le temps de demi-vie (équation [58]).

#### **4.3 Limitation des méthodes de calcul**

L'approche cinétique de la dénaturation thermique, comme toutes les simulations de phénomènes naturels, a ses limitations. Une de ces limitations, la plus évidente, est reliée à l'utilisation de l'équation [59], obtenue d'une formulation classique en cinétique (Capellos, C. et Bielski, B.H.J., 1972). La limite de d'utilisation de cette équation est:

$$[N]_o^{(1-n)} \geq (1-n)k_{app}t$$

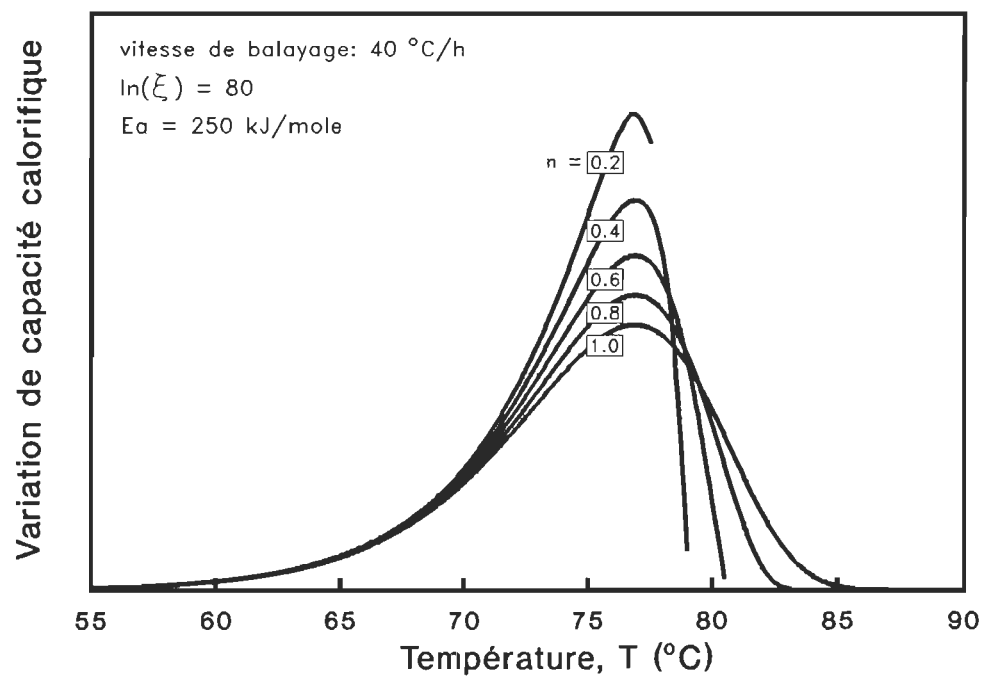
Lorsque cette condition n'est pas respectée, soit pour des valeurs de temps ( $t$ ) élevées, les racines de l'équation [59] peuvent être imaginaires, pour des valeurs  $1/(1-n)$  non entières.

La simulation de thermogramme par intégration numérique de l'équation [41] est illustrée à la figure 13. Dans ce cas, la solution est toujours applicable pour des valeurs de  $n$  égales ou supérieures à 1 (tracé continu et tangent aux extrémités)

mais, pour des valeurs de  $n$  inférieures à l'unité, il existe une brusque discontinuité au voisinage d'une température critique,  $T_c$ , telle que:

$$n > 1 - \frac{1}{\frac{\xi}{v} \int_{T_i}^{T_c} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) dT}$$

Jusqu'au voisinage de cette température critique,  $T_c$ , la transition peut être décrite par un modèle de dénaturation obéissant à des lois cinétiques, tandis que la fin de la transition thermique peut être associée à un phénomène secondaire que nous n'avons pas cherché à définir.



**Figure 13:** Figure de principe illustrant l'effet de l'ordre de dénaturation sur la variation de la capacité calorifique versus la température. L'équation [41] a été utilisée pour les simulations. Les paramètres cinétiques nécessaires à la simulation sont indiqués sur la figure en question.

Dans la partie résultats et discussions (chapitre 5), nous proposons une méthode simple qui consiste à évaluer les paramètres cinétiques d'une transition

jusqu'à une température critique,  $T_c$ , quelconque. Les paramètres cinétiques sont retenus pour un estimateur non biaisé de la variance (équation [50]) minimum.

En résumé, lorsque l'on veut évaluer les paramètres cinétiques d'une transition d'ordre inférieur à l'unité, on doit admettre que les valeurs de variation de capacité calorifique non nulles, mais voisines de la température finale, n'obéissent pas à des lois cinétiques simples et ne doivent pas être prises en compte lors de la paramétrisation. Cette discontinuité de la capacité calorifique n'est pas particulière à l'équation originale [41] mais est aussi présente dans l'expression proposée par Sanchez-Ruiz, J.M. (1992) bien que cette limitation ne soit pas clairement exprimée.

## 5 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre présente les principales observations expérimentales effectuées dans le cadre de cette étude. Ce chapitre est divisé en trois parties:

- 1- Dénaturation thermique de l'actine G
- 2- Dénaturation thermique de l'actine F
- 3- Effet thermostabilisant de la phalloïdine sur la dénaturation thermique de l'actine

Une description des résultats ainsi qu'un bref commentaire sur leur interprétation cinétique est présenté pour chacun des groupes de résultats. Les données brutes et un premier traitement est présenté en annexe B.

### 5.1 Dénaturation thermique de l'actine G

Les résultats de la dénaturation thermique de l'actine G sont groupés dans deux sections distinctes mais complémentaires qui permettent de mettre en évidence la dépendance cinétique de la dénaturation thermique de l'actine G. La première section présente l'étude isothermale de la dénaturation thermique de l'actine G mesurée par fluorescence intrinsèque, tandis que la seconde section présente l'étude effectuée par calorimétrie différentielle à balayage (D.S.C.).

#### 5.11 Cinétique de dénaturation thermique observée par fluorescence

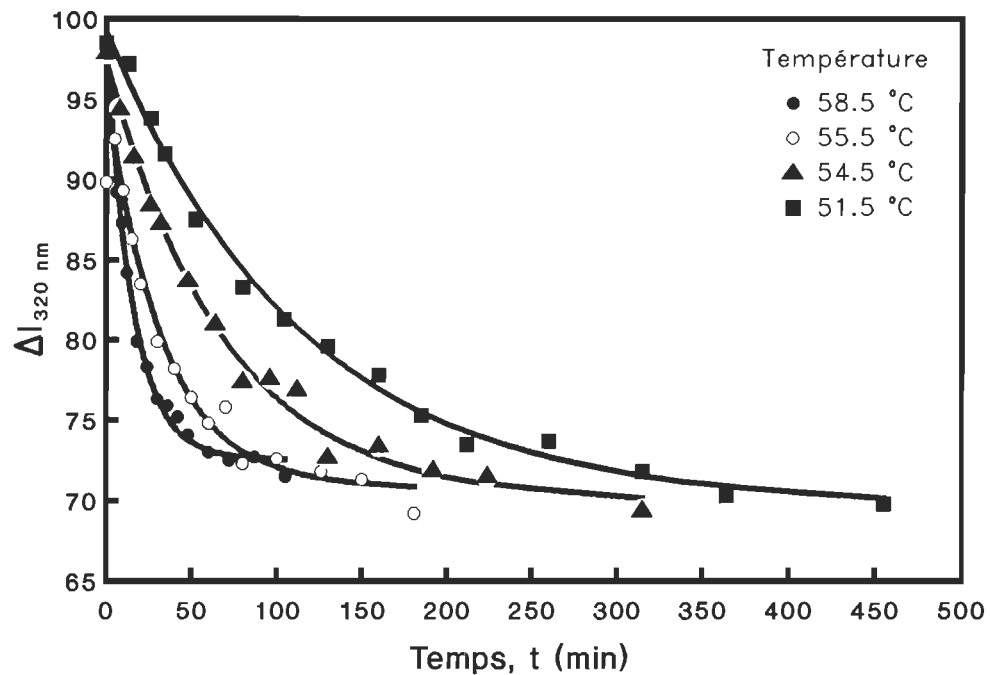
Dans cette section, nous mettons l'emphasis sur l'obtention de paramètres cinétiques courants tels l'énergie d'activation et le facteur de collision par la méthode d'Arrhénius. Toutefois, avant de faire des mesures quantitatives, nous avons vérifié que la dénaturation thermique de l'actine G obéit à des lois cinétiques simples.

##### *i) Effet de la température sur la cinétique de dénaturation*

**Résultats:** La figure 14 présente la variation d'intensité de fluorescence en fonction du temps obtenue avec l'actine G pour quatre différentes températures de dénaturation comprises entre 51.5 et 58.5°C. La mesure a été effectuée par variation

d'intensité de fluorescence à 320 nm pour une excitation à 294 nm. Chaque point représente la mesure effectuée sur 3 ml d'actine G à une concentration 0.05 mg/ml, selon la méthode décrite au chapitre 3, section 3.31. Le phénomène est monotone et décroissant. Le niveau final d'intensité de fluorescence est le même pour toutes les températures soit de l'ordre de 70 (unités relatives d'intensité de fluorescence). Le niveau final est atteint plus rapidement pour les hautes températures que pour les basses températures.

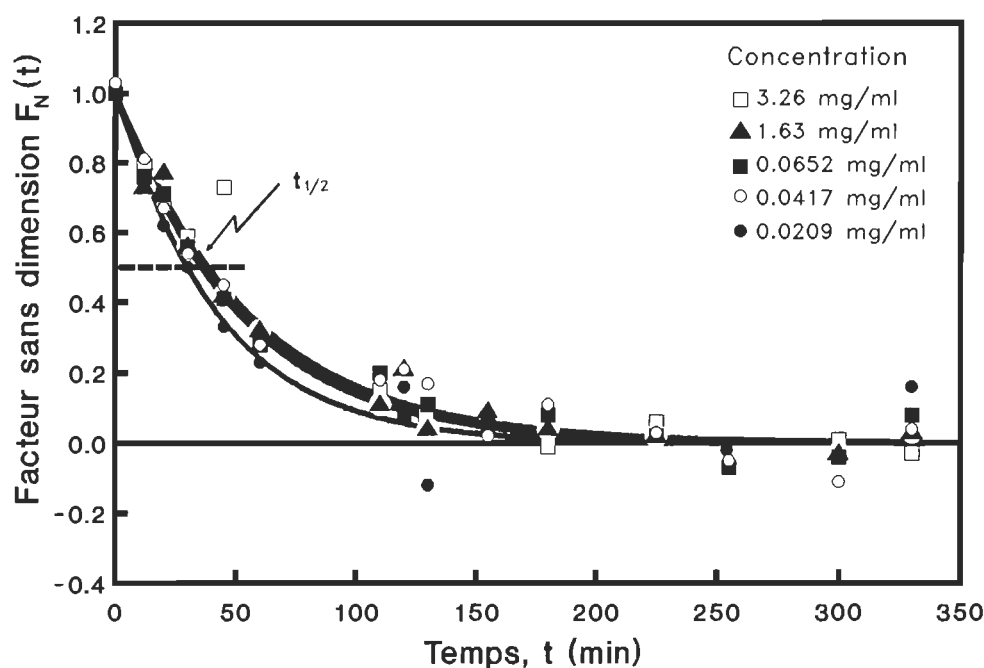
**Commentaires:** Sur cette figure, les courbes continues correspondent à une loi exponentielle décroissante (équation [52]) typique des mécanismes d'ordre un. La dénaturation thermique de l'actine G ne semble pas dépendre de la variation de la constante d'équilibre entre les deux états étant donné le peu d'influence de la température sur le niveau d'intensité final.



**Figure 14:** Effet de la température sur la vitesse de dénaturation de l'actine G. Les mesures ont été effectuées par variation d'intensité de fluorescence intrinsèque avec  $\lambda_{ex} = 294$  nm et  $\lambda_{em} = 320$  nm. La concentration d'actine G est de 0.05 mg/ml. Les températures de dénaturation sont indiquées dans le coin supérieur droit de la figure. Les courbes en continu sont associées à l'équation [52].

ii) *Effet de la concentration sur la cinétique de dénaturation*

**Résultats:** La figure 15 présente l'effet de la concentration d'actine G sur sa cinétique de dénaturation. Les données expérimentales ont été normalisées par l'utilisation d'un facteur  $F_N(t)$  pour éliminer la dépendance entre l'intensité de fluorescence et la concentration (équation [53]). La concentration d'actine G se situe entre 0.02 et 3.26 mg/ml. Les mesures ont été effectuées selon le protocole décrit à la section 3.31. Les solutions d'actine à 3.26 et 1.63 mg/ml ont été diluées 100 fois dans le tampon G avant la mesure de l'intensité de fluorescence à 320 nm. La température de dénaturation, a été dans tous les cas, de 55.5°C. Le phénomène normalisé est monotone décroissant et semble être indépendant de la concentration d'actine.



**Figure 15:** Effet de la concentration d'actine G sur sa vitesse de dénaturation. Les mesures ont été effectuées par fluorescence intrinsèque avec  $\lambda_{ex} = 294$  nm et  $\lambda_{em} = 320$  nm. La température de dénaturation a été de 55.5°C. Les concentrations d'actine G sont indiquées dans le coin supérieur droit de la figure. Les données expérimentales ont été normalisées pour éliminer l'effet de la concentration sur l'intensité de fluorescence à l'aide de l'équation [53]. Les courbes en continu sont associées à une exponentielle décroissante.

**Commentaires:** La figure 15 montre qu'il n'y a pas de modification de la cinétique de dénaturation due à la concentration de l'actine. Le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de la transition thermique de l'actine est quasi-indépendant de la concentration, ce qui confirme, dans une certaine mesure, que la dénaturation de l'actine G obéit à une cinétique d'ordre un et justifie l'utilisation d'une exponentielle décroissante pour en décrire le comportement thermique (Capellos, C. et Bielski, B.J., (1972).

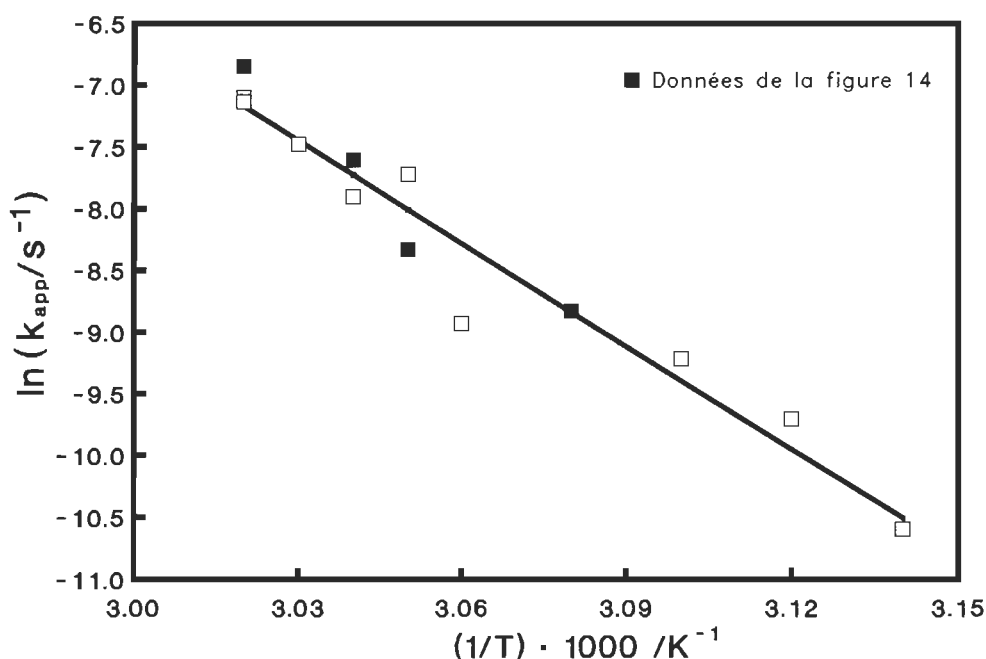
De ces deux groupes d'essais, on peut déduire:

- que la dénaturation est sous contrôle cinétique (figure 14),
- que l'ordre de cette dénaturation est voisin de l'unité (figure 15).

Lors de la dénaturation thermique de l'actine, il ne semble pas y avoir d'équilibre entre les états natif et dénaturé de la protéine.

### *iii) Relation d'Arrhénius*

La figure 16 est un graphique d'Arrhénius obtenu à partir des données des courbes de variation d'intensité de fluorescence selon les équations [11] et [12]. La pente de cette relation fournit une valeur de l'énergie d'activation de l'ordre de 230 kJ/mole, valeur comparable à celle obtenue pour d'autres protéines (Sanchez-Ruiz, J.M. *et al*, 1988).



**Figure 16:** Relation d'Arrhénius effectuée à partir de courbes isothermales obtenues par fluorescence intrinsèque. L'ensemble de ces courbes isothermales se retrouve en annexe.

### 5.12 Dénaturation thermique observée par D.S.C.

Dans cette section, les paramètres cinétiques  $E_a$  et  $\ln(A)$  sont évalués à l'aide de la calorimétrie différentielle à balayage. L'évaluation de ces paramètres cinétiques s'est effectuée selon deux méthodes:

- 1- à l'aide d'un seul thermogramme (interprétation basée sur la forme de la transition),
- 2- à l'aide de plusieurs thermogrammes (relation entre la température de transition,  $T_m$ , et la vitesse de balayage,  $v$ ).

#### *i) Méthode du thermogramme simple*

**Résultats:** La figure 17 est un thermogramme associé à la dénaturation de l'actine G à une concentration de 3.43 mg/ml. La température de transition ( $T_m$ ) obtenue est de 60.8°C pour une vitesse de balayage de 37.5°C/h. La transition est d'allure simple et est irréversible étant donné que le thermogramme est plat lorsqu'on balaye

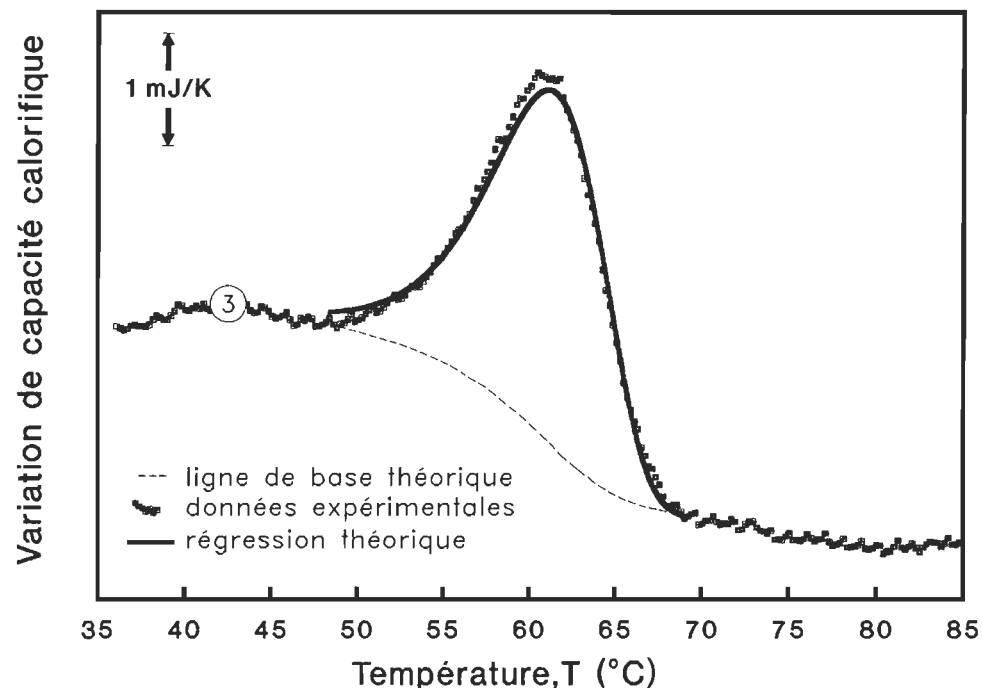


une seconde fois le même intervalle de température (résultat non montré). La ligne de base de la figure 17 est une sigmoïde correspondant à la répartition de la dépendance linéaire de la variation de capacité calorifique de la protéine avant et après la transition thermique. Le développement de cette relation est celui suggéré par Takahashi, K. et Sturtevant, J.M. (1981):

$$L(T) = (o_1 + p_1 T)(1 - \alpha) + (o_2 + p_2 T)\alpha \quad [61]$$

- $o_1$  : ordonné à l'origine de la variation de capacité calorifique avant la transition
- $p_1$  : pente de la relation de la variation de capacité calorifique avant la transition
- $o_2$  : ordonné à l'origine de la variation de capacité calorifique après la transition
- $p_2$  : pente de la relation de la variation de capacité calorifique après la transition
- $L(T)$  : ligne de base sigmoïde

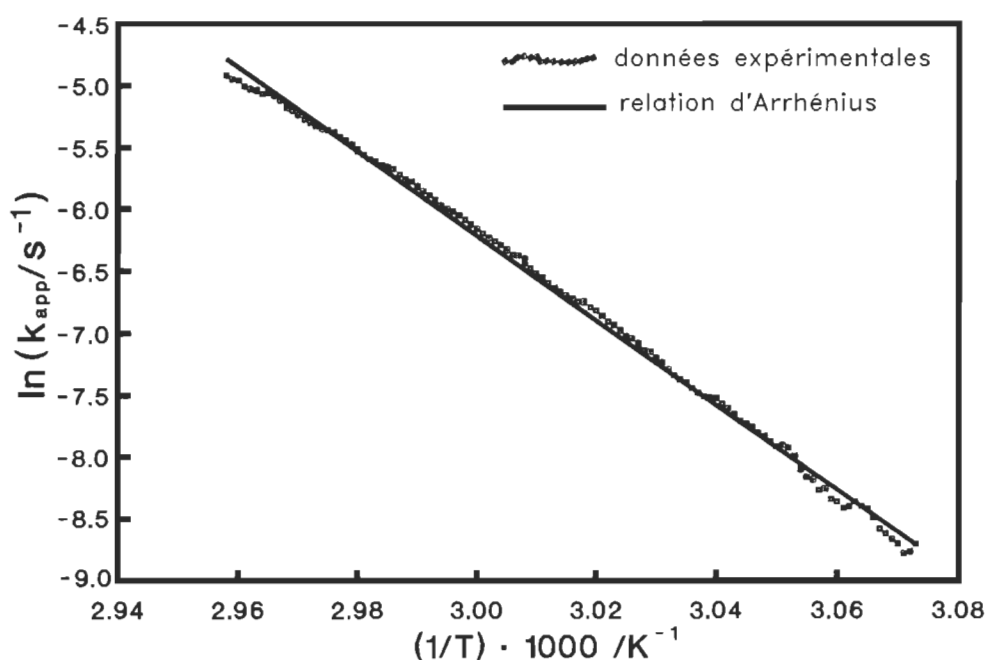
L'enthalpie calorimétrique est de 664 kJ/mole, et le rapport de coopérativité est évalué à 0.70, valeur voisine de celles obtenues par A. Bertazzon *et al* (1990) et L.V. Tatumashvili, L.V. et Privalov, P.L. (1984).



**Figure 17:** Tracé calorimétrique associé à la dénaturation thermique de l'actine G. La concentration d'actine est de 3.43 mg/ml et la vitesse de balayage de 37.5°C/h. La courbe en continu est obtenue à partir de l'équation [30] et la ligne de base provient de l'application de l'équation [61].

La figure 18 présente, dans l'espace graphique d'Arrhénius, l'interprétation cinétique du tracé calorimétrique de la figure 17. L'évaluation de la constante de vitesse s'est effectuée à l'aide de l'équation [15] proposée par J.M. Sanchez-Ruiz (1988). L'énergie d'activation ainsi évaluée est de l'ordre de 285 kJ/mole. La relation d'Arrhénius est linéaire au voisinage de la température de transition, soit pour une plage de température de 52°C à 65°C.

La courbe continue de la figure 17 est une simulation effectuée avec ces paramètres cinétiques selon le modèle binaire irréversible d'ordre 1 représenté par l'équation [30].

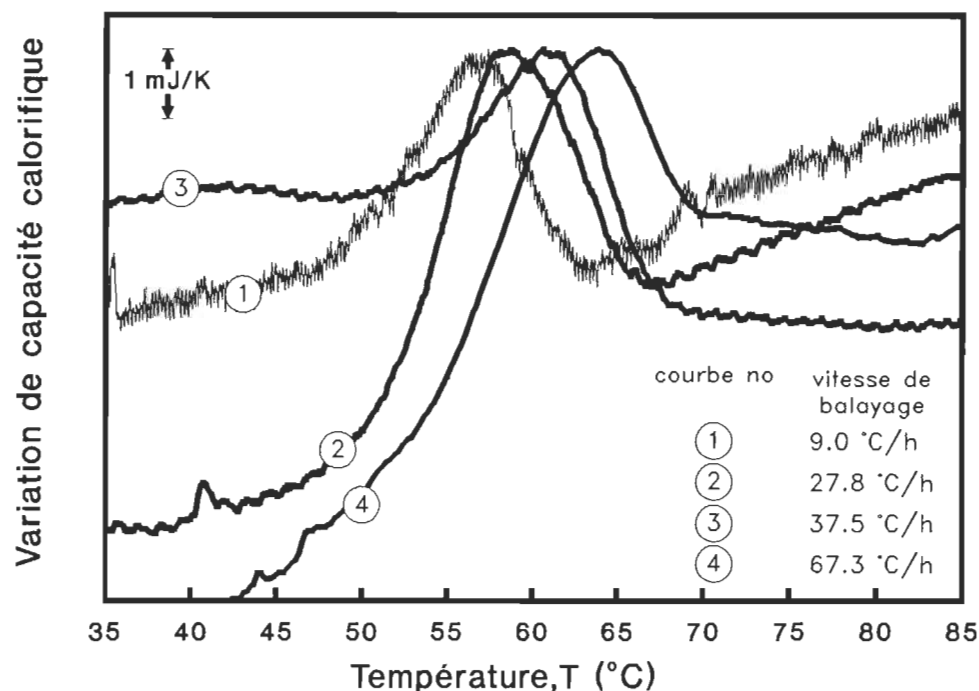


**Figure 18:** Relation d'Arrhénius évaluée à partir du thermogramme de la figure 17. Les constantes de vitesses ont été évaluées à chaque 0.1°C selon l'équation [15] et seulement dans la région de la transition thermique.

**Commentaires:** L'interprétation cinétique de la dénaturation thermique de l'actine G par D.S.C. fournit des paramètres du même ordre de grandeur que ceux obtenus par fluorescence. Cette similitude contribue à montrer la pertinence de l'application de l'approche cinétique présentée au chapitre 4.

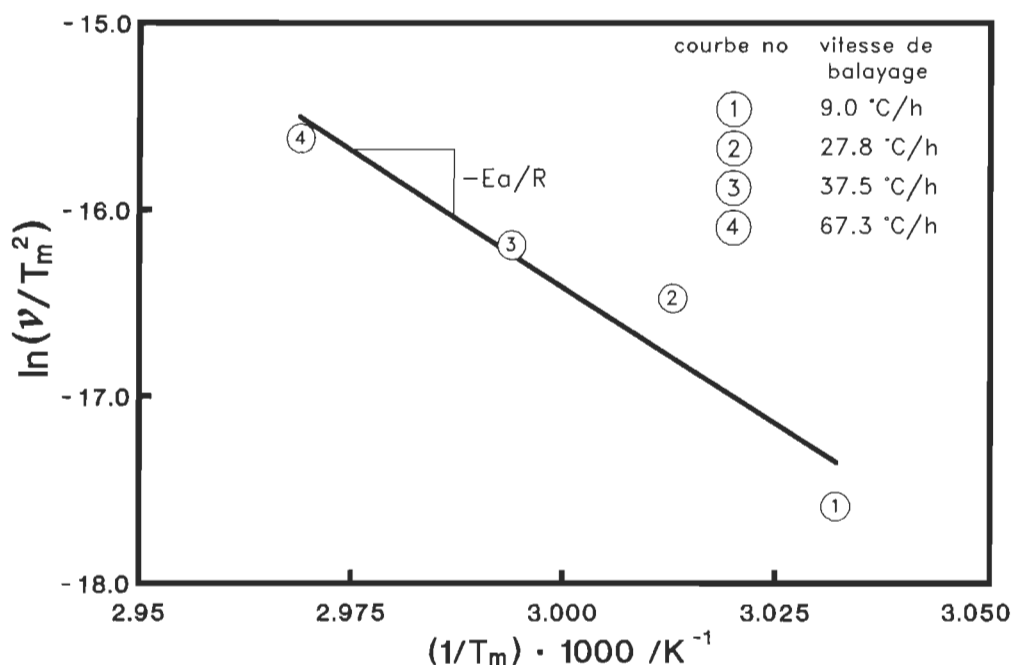
ii) Méthode des thermogrammes multiples

**Résultats:** La figure 19 montre l'effet de la vitesse de balayage sur la transition thermique de l'actine G. La concentration d'actine a été, pour les quatre courbes, de 3.43 mg/ml. La température de transition ( $T_m$ ) de l'actine G augmente pour des vitesses de balayage plus élevées. De faibles vitesses de balayage ont été utilisées pour palier à toute modification des transitions dûe au temps de réponse de l'appareil. Même après correction, la dépendance de la température de transition envers la vitesse de balayage reste évidente.



**Figure 19:** Effet de la vitesse de balayage sur la dénaturation thermique de l'actine G. Les concentrations d'actine G sont de 3.43 mg/ml. Les vitesses de balayage sont indiquées dans le coin inférieur droit de la figure.

La figure 20 illustre, dans l'espace graphique d'Arrhénius défini par l'équation [16] (Sanchez-Ruiz, J.M. *et al*, 1988), la dépendance entre la température de transition et la vitesse de balayage des tracés calorimétriques de la figure 19. La valeur de l'énergie d'activation évaluée par la pente de cette relation est de l'ordre de 245 kJ/mole.



**Figure 20:** Relation entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine G et la vitesse de balayage ( $v$ ). La détermination des paramètres cinétiques,  $E_a$  et  $\ln(A)$ , a été effectuée à partir d'une régression linéaire de  $\ln(v/T_m^2)$  versus  $1/T_m$  selon l'équation [16]. Les données de base proviennent des thermogrammes de la figure 19.

**Commentaires:** L'influence de la vitesse de balayage sur la température de transition de l'actine G a déjà été montrée à la figure 6 avec des données obtenues par d'autres auteurs. Cette méthode permet d'obtenir les paramètres cinétiques, à partir de l'interprétation de plusieurs tracés calorimétriques et montre une fois de plus, la dépendance cinétique de la dénaturation thermique de l'actine G. Les paramètres provenant de la figure 20 sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par des méthodes et des techniques différentes (technique isothermale et thermogramme simple).

### 5.13 Comparaison des résultats obtenus

Le tableau 6 présente la synthèse des paramètres cinétiques obtenus sur l'actine G par différentes techniques et méthodes. Les valeurs des paramètres obtenus par fluorescence sont semblables aux valeurs obtenues par calorimétrie différentielle à balayage. Ceci confirme qu'avec les deux techniques, on mesure le même phénomène soit: le déploiement partiel de la protéine induit par une hausse de température.

**Tableau 6**

Paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine G évalués à l'aide de différentes méthodes

Technique	Ea kJ/mole	ln(A/s <sup>-1</sup> )
Intensité de fluorescence <sup>1</sup>	231 ± 17	76.8 ± 0.3
Thermogramme simple (D.S.C.) <sup>2</sup>	285 ± 2	96.5 ± 0.5
Thermogrammes multiples (D.S.C.) <sup>3</sup>	244 ± 50	81.8 ± 0.1

1 Paramètres cinétiques évalués à partir de la relation d'Arrhénius de la figure 16

2 Paramètres cinétiques évalués à partir de la relation d'Arrhénius de la figure 18

3 Paramètres cinétiques obtenus à l'aide de l'équation [16] sur le graphique de la figure 20

## 5.2 Dénaturation thermique de l'actine F

Les résultats de la dénaturation thermique de l'actine F ont été groupés dans deux sections. Tout comme pour l'actine G, la première section présente une étude isothermale par mesure de la fluorescence. Des modifications du protocole général exposé au chapitre 3, section 3.32, sont décrites. La seconde section présente une étude par calorimétrie différentielle à balayage.

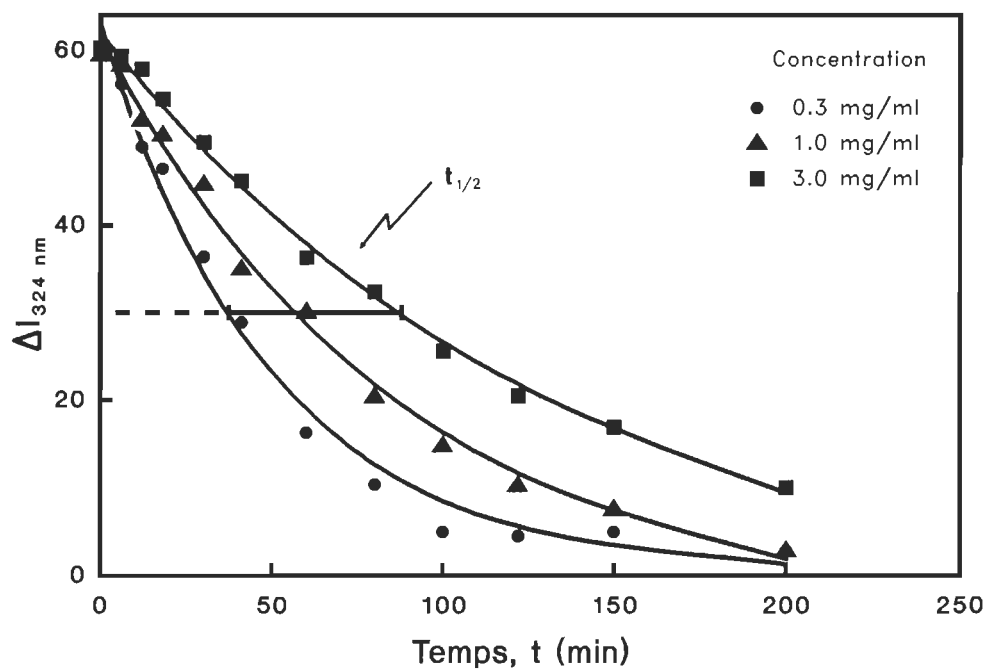
### 5.21 Cinétique de dénaturation thermique observée par fluorescence

L'interprétation cinétique de la dénaturation thermique observée par

fluorescence est, dans le cas de l'actine F, plus complexe que pour l'actine G. Une première interprétation, selon un modèle simple, a montré, en effet, que pour décrire correctement le comportement thermique de l'actine F, l'introduction de la notion d'ordre était quasi-indispensable. Cette constatation a contraint au développement des solutions numériques pour des ordres  $n$  quelconques, solutions qui sont présentées au chapitre 4, partie 4.1.

i) *Effet de la concentration sur la cinétique de dénaturation*

La figure 21 présente l'effet de la concentration d'actine F sur sa cinétique de dénaturation. Lors de la dénaturation, les volumes d'actine F ont été de 0.1 ml pour des concentrations de 3 mg/ml à 1 mg/ml et de 0.15 ml pour une concentration de 0.3 mg/ml.

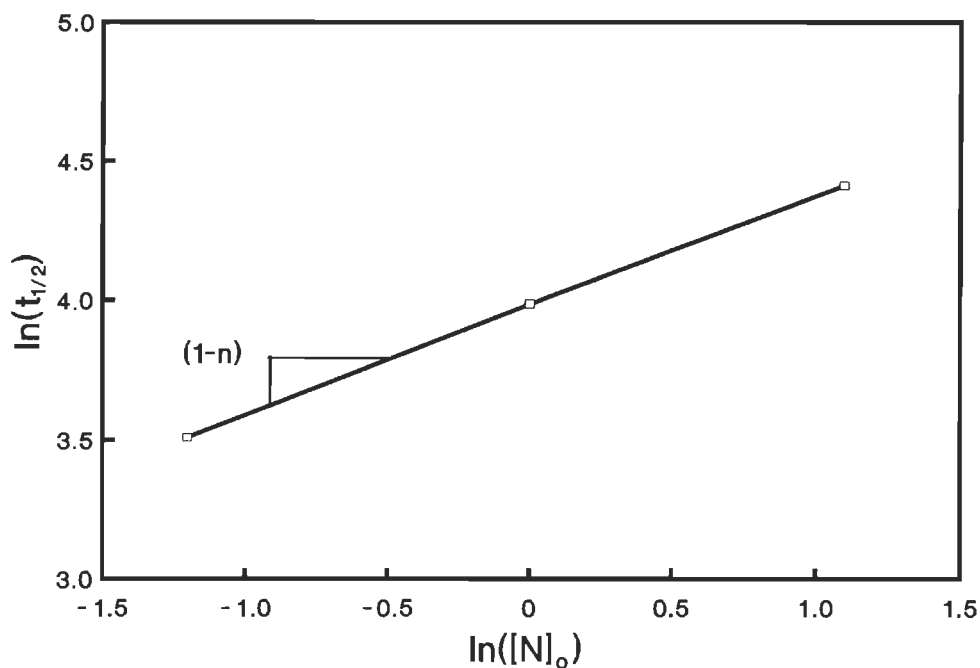


**Figure 21:** Effet de la concentration de l'actine F sur sa vitesse de dénaturation. La température de dénaturation est de 59°C, les concentrations respectives sont indiquées dans le coin supérieur droit de la figure. Les paramètres de fluorescence usuels sont:  $\lambda_{ex} = 294$  nm et  $\lambda_{em} = 324$  nm. Les courbes continues sont obtenues d'une exponentielle décroissante.

Dans tous les cas, la mesure de fluorescence s'est effectuée après dilution jusqu'à une concentration de 0.015 mg/ml. Les mesures ont été effectuées par variation d'intensité de fluorescence à 324 nm et excitation à 294 nm. La température de dénaturation a été dans tous les cas de 59°C. Le phénomène est monotone et est plus rapide à faible concentration.

**Commentaires:** Contrairement à l'actine G, le temps de demie-vie ( $t_{1/2}$ ) varie selon la concentration initiale (voir figure 22), variation décrite par l'équation [54] qui introduit la notion d'ordre  $n$ .

$$t_{1/2} = \left[ \frac{2^{(n-1)} - 1}{(n-1)k_{app}[N]_o^{(n-1)}} \right]$$

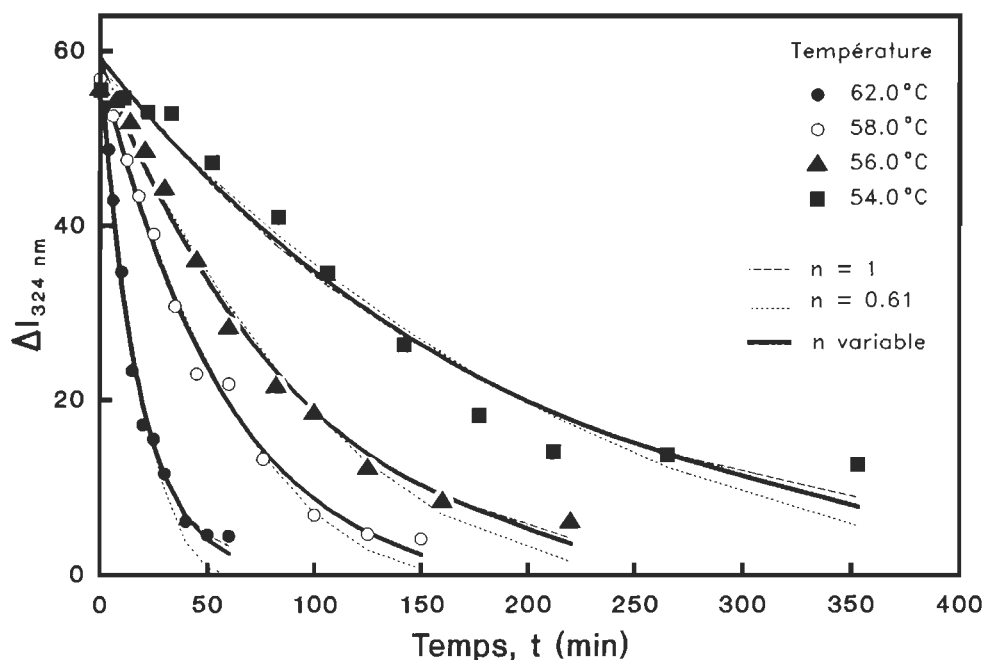


**Figure 22:** Relation entre la concentration initiale d'actine F et le temps de demi-vie. Cette relation est une application de l'équation [58] et permet d'évaluer facilement l'ordre de la dénaturation à partir de la pente.

Les temps de demi-vie, dans ce cas, sont respectivement de 82.4, 53.9 et 33.4 min pour des concentrations de 3 mg/ml, 1 mg/ml et 0.3 mg/ml. L'ordre de la dénaturation a été évalué à 0.61 par régression entre le temps de demi-vie et la concentration initiale (équation [58]) tel qu'illustré à la figure 22.

ii) *Effet de la température sur la cinétique de dénaturation*

La figure 23 montre l'effet de la température sur la vitesse de dénaturation de l'actine F. Les températures de dénaturation varient de 54 à 62°C. Les mesures ont été effectuées par variation d'intensité de fluorescence à 324 nm et excitation à 294 nm. Dans tous les cas, la concentration d'actine F durant la dénaturation était de 0.29 mg/ml tandis que la mesure a été effectuée après dilution jusqu'à une concentration de 0.015 mg/ml. Le phénomène est monotone mais nettement plus rapide pour les températures élevées.



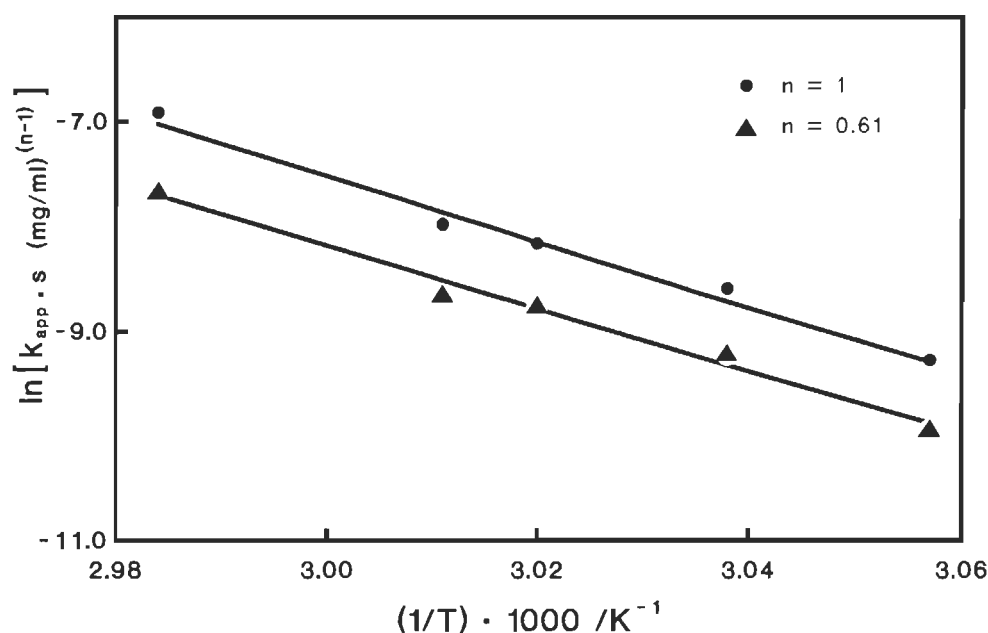
**Figure 23:** Effet de la température sur la vitesse de dénaturation de l'actine F. La concentration de l'actine F est de 0.29 mg/ml, les températures de dénaturation sont indiquées dans le coin supérieur droit de la figure. Les paramètres de fluorescence sont:  $\lambda_{\text{ex}} = 294 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 324 \text{ nm}$ . Concernant les types de régressions, se référer au texte.



**Commentaires:** Les simulations pour différents ordres sont présentées sur la figure 23. Ces simulations effectuées par les équations [59] pour des  $n \neq 1$  et [52] pour  $n = 1$  qui respectent la condition limite expérimentale observée;  $C=0$  à  $t=\infty$ . La courbe  $n$  variable permet deux degrés de liberté (l'ordre  $n$  et la constante de vitesse). Toutes ces simulations reproduisent les valeurs obtenues à l'intérieur de la plage des erreurs expérimentales (les simulations se confondent en grande partie) et montrent ainsi que la détermination d'un ordre  $n$  à partir de tels résultats est hasardeuse. Cet ordre  $n$  peut être évalué par une méthode plus sensible telle la relation entre le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) et la concentration initiale ( $[N]_0$ ).

### iii) Relation d'Arrhénius

**Résultats:** Pour des ordres de réaction proches de l'unité, la relation entre la constante de vitesse et la température est bien décrite par une loi d'Arrhénius (Sanchez-Ruiz, J.M., 1992).



**Figure 24:** Relation d'Arrhénius évaluée à partir de courbes isothermales obtenues par fluorescence intrinsèque sur les 5 cinétiques de dénaturation de la figure 23 en considérant différents ordres de dénaturation possibles.

Les deux courbes de la figure 24 présentent les relations obtenues par interprétation cinétique des données de la figure 23 pour des ordres  $n = 1$  et  $n = 0.61$ .

**Commentaires:** L'énergie d'activation obtenue des pentes de ces courbes est d'environ 250 kJ/mole quelque soit l'ordre ( $n$ ) considéré. Ikeuchi *et al* (1981) ont déduit par mesure de l'activité HMM ATPasique, une énergie d'activation de 180 kJ/mole pour l'actine F, une valeur qui diffère de 30% de la valeur déduite de la variation d'intensité de fluorescence. Toutefois, Ikeuchi n'a pas tenté de vérifier la relation entre la concentration initiale ( $[N]_0$ ) d'actine F et le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ).

L'énergie d'activation de l'actine F peut être déduite des courbes isothermales obtenues lors de la dénaturation à différentes températures. L'ordre de la réaction ne peut pas être facilement déduit de courbes isothermales pour une même concentration. Il semble préférable d'évaluer l'ordre de la dénaturation à partir de la relation entre le temps de demi-vie et la concentration de l'espèce impliquée (équation [58]) comme illustré à la figure 22. Dans notre cas, l'ordre ( $n$ ) évalué selon cette équation [58] est inférieur à l'unité, soit 0.61.

### 5.22 Dénaturation thermique observée par D.S.C.

Les paramètres cinétiques de dénaturation thermique ont également été évalués par calorimétrie différentielle à balayage. Les résultats obtenus ont été traités par deux méthodes différentes, soit:

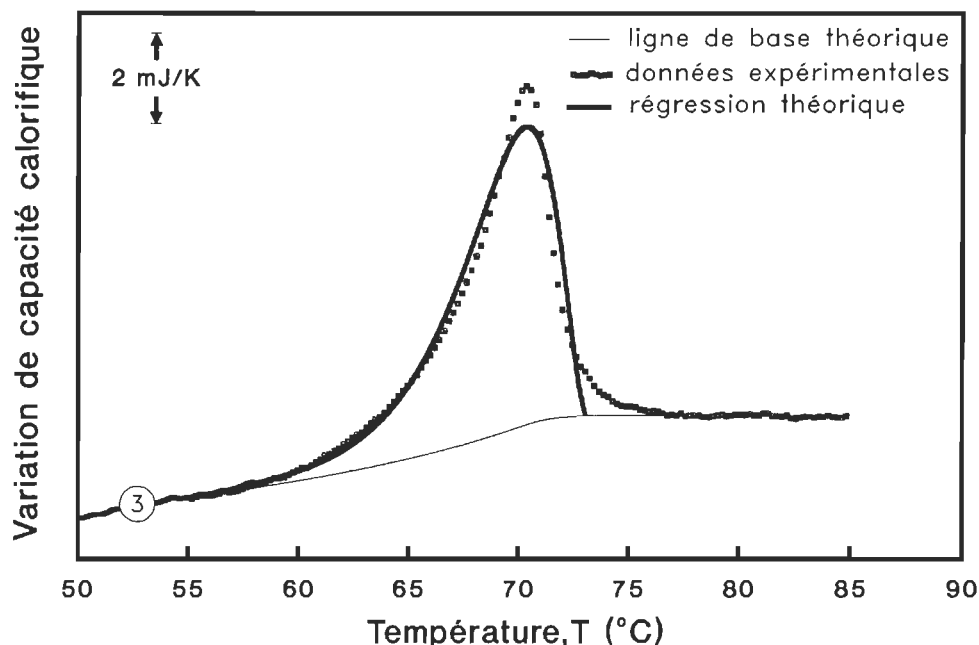
- par traitement d'un tracé calorimétrique unique (thermogramme simple),
- par traitement de plusieurs tracés calorimétriques effectués à différentes vitesses de balayage.

Contrairement à l'actine G, l'introduction d'un ordre de réaction différent de l'unité rend l'interprétation des tracés calorimétriques plus complexe.

#### *i) Méthode du thermogramme simple*

**Résultats:** La figure 25 présente le tracé calorimétrique de la dénaturation thermique de l'actine F à une concentration de 3.55 mg/ml pour une vitesse de balayage de

37.47°C/h. La température de transition ( $T_m$ ) obtenue dans ces conditions est de 70.35°C. L'enthalpie calorimétrique est de 880 kJ/mole pour un rapport coopératif de 0.89. La dénaturation est irréversible.



**Figure 25:** Tracé calorimétrique associé à la dénaturation thermique de l'actine F. La concentration d'actine est de 3.55 mg/ml et la vitesse de balayage est de 37.47°C/h. La courbe en continu est obtenue à partir de l'équation [41] et la ligne de base provient de l'application de l'équation [61].

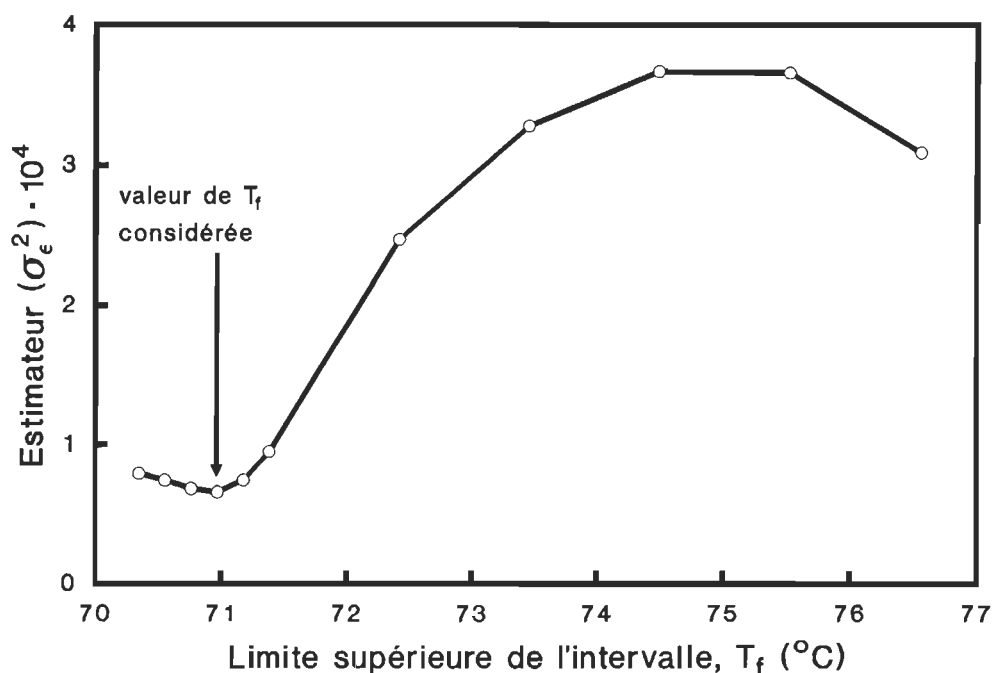
**Commentaires:** Comme pour l'actine G, la ligne de base de la figure 25 est une sigmoïde correspondant à la répartition de la dépendance linéaire de la variation de capacité calorifique de la protéine avant et après la transition thermique (équation [61]).

Pour l'actine F, A. Bertazzon *et al* (1990) ont évalué, par D.S.C., une enthalpie calorimétrique de 753 kJ/mole soit du même ordre de grandeur que la valeur obtenue dans cette étude.

L'évaluation des paramètres cinétiques s'est effectuée avec la méthode

matricielle détaillée au chapitre 4, à l'item 4.12 ii, en utilisant les données expérimentales dans un intervalle  $[T_i, T_f]$  variable. L'aspect très général de l'équation [41] admet l'existence d'ordres différents de l'unité, et implicitement, une température critique  $T_c$  (commentée au chapitre 4, partie 4.3) au-delà de laquelle la solution n'est plus applicable. Avant toute interprétation, l'intervalle des données expérimentales utilisables doit donc être défini afin d'éliminer l'influence des phénomènes secondaires associés à la fin de la transition.

Le début de la transition est caractérisé par la convergence de toutes les solutions (voir figure 13) et la définition de la limite inférieure de l'intervalle a peu d'influence sur la paramétrisation. La méthode se borne donc à faire varier la limite supérieure ( $T_f$ ) et d'évaluer pour chaque intervalle ainsi défini, la justesse des paramètres cinétiques par le biais d'un estimateur  $\sigma_\epsilon^2$  défini par l'équation [50]. La figure 26 présente l'optimisation de la borne supérieure  $T_f$ , en fonction de l'estimateur  $\sigma_\epsilon^2$ .



**Figure 26:** Graphique illustrant l'optimisation de l'intervalle par la relation entre la température finale et l'estimateur. Données calorimétriques provenant de la figure 25.

Les paramètres cinétiques,  $E_a$ ,  $\ln(\xi)$  et  $n$ , obtenus pour différentes valeurs de  $T_f$ , caractérisant l'intervalle utilisé, sont présentés au tableau 7. La valeur minimum de l'estimateur est obtenue pour l'intervalle correspondant à un  $T_f$  de 70.97°C. A cet intervalle est associé une énergie d'activation de 390 kJ/mole et un ordre  $n$ , de 0.68.

Le tableau 7 montre la relation entre l'ordre de la réaction et l'allure de la transition; ainsi les ordres  $n \geq 1$  ne sont obtenus que pour des intervalles qui incluent la partie concave de fin de transition ( $T_f \geq 73^\circ\text{C}$ ) tandis que le meilleur estimateur ( $\sigma_\epsilon^2 = 0.66$  pour  $T_f = 70.97^\circ\text{C}$ ) exclut complètement la fin de la transition et correspond à un ordre  $n = 0.68$ . Ce tableau montre également la variation des paramètres cinétiques en fonction du choix de l'intervalle; l'énergie d'activation  $E_a$  et le facteur de collision pondéré  $\ln(\xi)$ , sont peu influencés par le choix de l'intervalle ( $\pm 5\%$  pour la plage utilisée) tandis que l'ordre de la réaction varie presque d'un facteur 2 pour la même plage.

**Tableau 7**

Estimation des paramètres cinétiques en fonction de l'intervalle considéré: cas de l'actine F

$T_f$ °C	$E_a$ kJ/mole	$\ln(\xi/\text{s}^{-1})$	$n$	$\sigma_\epsilon^2 \cdot 10^4$
76.56	411	138.741	1.131	3.09
75.53	440	148.983	1.267	3.66
74.49	436	147.562	1.236	3.67
73.46	425	143.822	1.142	3.28
72.42	412	138.895	0.989	2.47
71.38	394	132.448	0.740	0.95
71.18	391	131.552	0.699	0.74
<b>70.97</b>	<b>390</b>	<b>131.082</b>	<b>0.676</b>	<b>0.66</b>
70.76	390	131.177	0.681	0.68
70.56	392	131.774	0.714	0.74
70.35	395	132.789	0.774	0.79

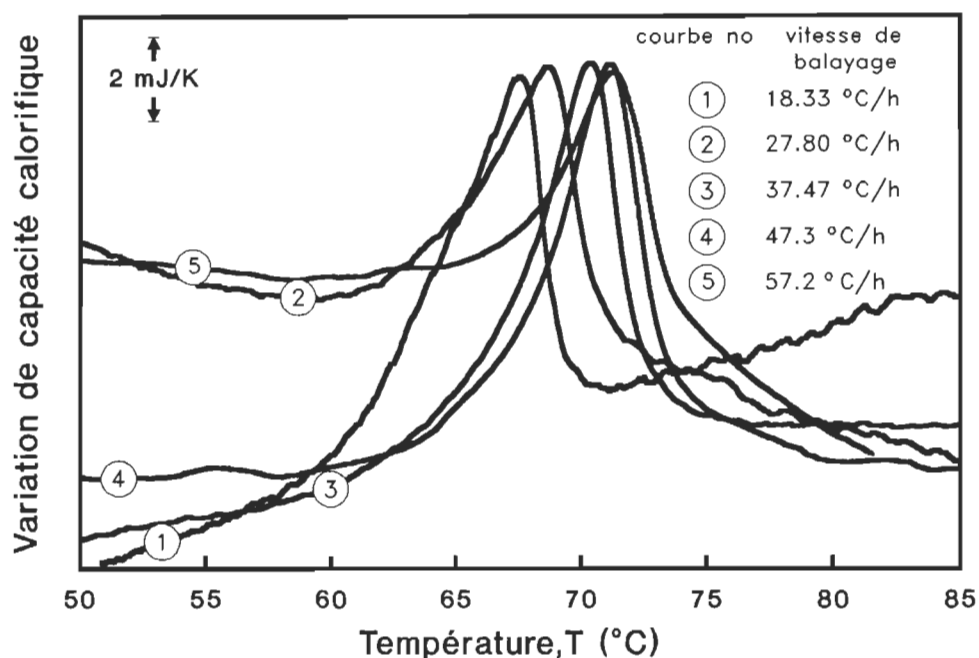
L'évaluation de ces paramètres a été effectuée sur le tracé calorimétrique de la figure 25 pour une température initiale  $T_i$  de l'intervalle  $[T_i, T_f]$  de 58.09°C.

La courbe continue sur la figure 25 correspond à la solution numérique utilisant les paramètres cinétiques correspondant à l'estimateur minimum. La température critique ( $T_c$ ) qui correspond à la limite d'utilisation de cette solution est de l'ordre de 73°C et la fin de la transition ne peut être reproduite par les paramètres utilisés.

## ii) *Méthode des thermogrammes multiples*

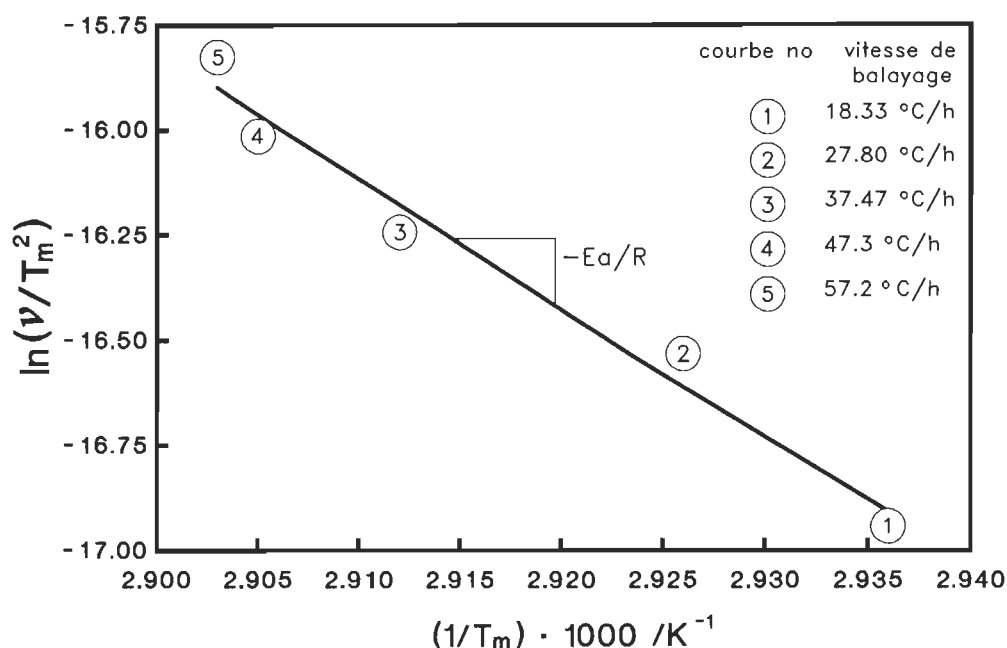
L'évaluation de l'énergie d'activation et du facteur de collision selon la méthode de Sanchez-Ruiz, J.M. *et al* (1988) est basée sur l'hypothèse d'un ordre de dénaturation égal à l'unité. Toutefois, la figure 13 montre que différentes hypothèses sur l'ordre de réaction ont très peu d'effet sur la température de transition et le tableau 7 montre que l'énergie d'activation et le facteur de collision sont peu influencés par l'incertitude de l'ordre de la réaction. L'application de l'équation [16] est donc justifiée pour évaluer l'énergie d'activation et le facteur de collision, même pour des ordres de réactions inférieurs à l'unité. Une analyse plus détaillée est présentée en annexe A.

**Résultats:** La figure 27 illustre l'effet de la vitesse de balayage ( $v$ ) sur la température de transition ( $T_m$ ). La concentration d'actine F a été de 3.55 mg/ml pour l'ensemble des tracés calorimétriques. De faibles vitesses de balayage ont été utilisées pour pallier à des modifications des transitions dues au temps de réponse de l'appareil. Les paramètres cinétiques ( $E_a$  et  $\ln(A)$ ) sont évalués en effectuant une régression linéaire de  $\ln(v/T_m^2)$  versus  $1/T_m$  selon l'équation [16] illustrée à la figure 28. L'énergie d'activation évaluée à l'aide de cette méthode est de 254 kJ/mole.



**Figure 27:** Effet de la vitesse de balayage sur la dénaturation thermique de l'actine F. Les concentrations d'actine F sont de 3.55 mg/ml. Les vitesses de balayage sont indiquées dans le coin supérieur droit de la figure.

**Commentaires:** Cette dépendance de la température de transition ( $T_m$ ) envers la vitesse de balayage est spécifique des phénomènes cinétiques mais il est clair qu'avec cette méthode, l'ordre ( $n$ ) du mécanisme de dénaturation ne peut être évalué.



**Figure 28:** Relation entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine F et la vitesse de balayage ( $\nu$ ). La détermination des paramètres cinétiques ( $E_a$  et  $\ln(A)$ ) a été effectuée à partir d'une régression linéaire de  $\ln(\nu/T_m^2)$  versus  $1/T_m$  selon l'équation [16]. Les données de base proviennent des thermogrammes de la figure 27.

### 5.23 Comparaison des résultats obtenus

Les résultats obtenus sur l'actine F sont présentés au tableau 8. Ces résultats sont moins homogènes que pour l'actine G. Quelle que soit la technique utilisée, l'ordre  $n$  de dénaturation est inférieur à l'unité et quasi constant (0.6 à 0.7). L'énergie d'activation obtenue par variation d'intensité de fluorescence coïncide assez bien avec la valeur provenant de l'interprétation de thermogrammes multiples soit environ 250 kJ/mole. L'énergie d'activation obtenue par l'interprétation d'un seul thermogramme est par contre beaucoup plus élevée (390 kJ/mole).



**Tableau 8**

Paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine F évalués à l'aide de différentes méthodes

Techniques	Ea kJ/mole	$\ln(\xi/s^{-1})$ ou $\ln[A \cdot s \cdot (\text{mg/ml})^{(n-1)}]$
<i>Intensité de fluorescence</i>		$\ln(A)$
n imposé ( $n = 0.61$ ) <sup>1</sup>	$248 \pm 17$	$81.1 \pm 0.1$
n = 1	$258 \pm 17$	$85.3 \pm 0.1$
<i>Thermogramme simple (D.S.C.)</i> <sup>2</sup>		$\ln(\xi)^4$
n = $0.677 \pm 0.004$	$390 \pm 50$	$131 \pm 0.2$
<i>Thermogrammes multiples (D.S.C.)</i> <sup>3</sup>		$\ln(\xi)^5$
n non évalué	$255 \pm 23$	$83.3 \pm 0.06$

- 1 Les paramètres cinétiques ont été évalués à partir de la relation d'Arrhénius (figure 24), la valeur de n est estimée à l'aide de l'équation [59] sur les courbes de la figure 22.
- 2 La relation entre  $k_{app}$  et la température est évaluée à l'aide de la méthode matricielle de l'item 4.12 ii.
- 3 Paramètres cinétiques évalués avec l'aide de l'équation [16] sur les thermogrammes de la figure 26.
- 4 Étant donné que l'ordre n de la dénaturation est proche de l'unité, la valeur de  $\ln(\xi)$  est voisine de  $\ln(A)$  selon l'équation [38].
- 5 La valeur de  $\ln(\xi)$  est déterminée à partir de l'équation [A16] en considérant  $n = 0.677$  et  $\alpha_m \approx 0.5$ .

### **5.3 Étude d'un cas: l'interaction entre l'actine et la phalloïdine**

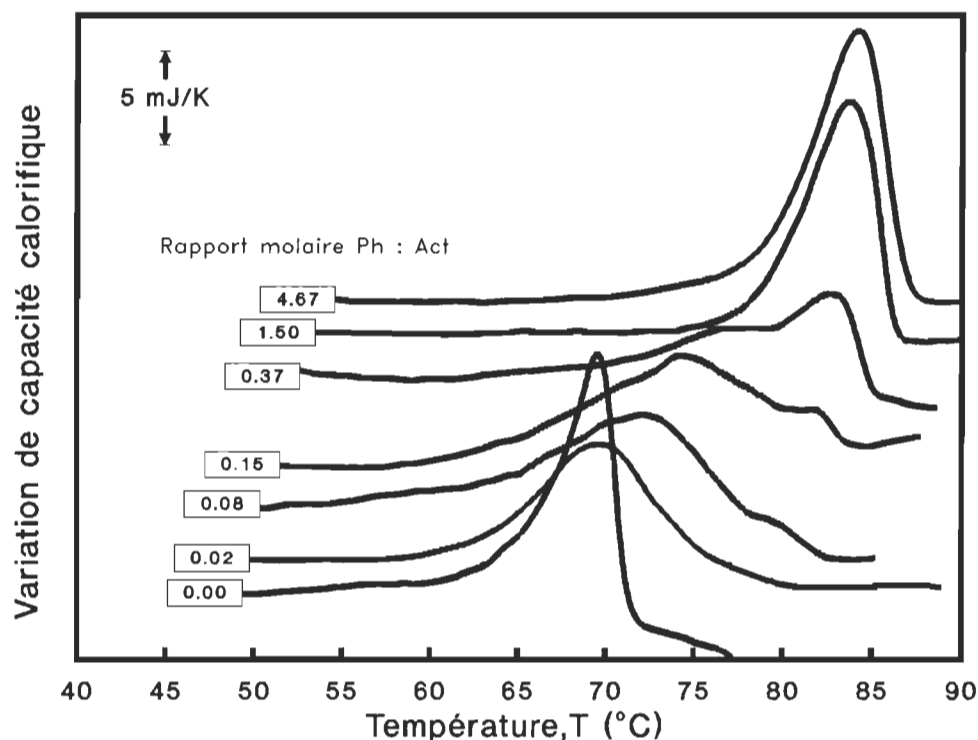
Cette étude a été effectuée en deux étapes; la première étape a consisté en une étude semi-quantitative de l'effet de la phalloïdine sur l'actine et a permis de décrire certains aspects de leur interaction et la mise au point de cadres expérimentaux plus formels. En seconde étape, il a ensuite été possible d'appliquer les outils d'interprétations développés au chapitre 4. Toutefois, ces interprétations n'ont pas permis de quantifier l'interaction phalloïdine/actine mais n'ont servi qu'à décrire le comportement thermique du complexe actine-phalloïdine.

### 5.31 Caractérisation qualitative de l'interaction

Dans cette partie, l'interaction entre l'actine et la phalloïdine est caractérisée globalement par calorimétrie différentielle à balayage. Les résultats présentés ici ont été obtenus sur un Microcal MC-1 à une vitesse de balayage fixe de 40°C/h et ont déjà fait l'objet d'une publication (Le Bihan, T. et Gicquaud, C., 1991).

#### i) Effet de la phalloïdine sur la thermostabilité de l'actine F

**Résultats:** La figure 29 illustre 7 courbes de dénaturation thermique d'actine F à une concentration fixe d'actine de 3 mg/ml et différentes concentrations de phalloïdine. En absence de phalloïdine (rapport molaire phalloïdine:actine = 0.00), la température de transition de l'actine F est de 69.5°C.



**Figure 29:** Effet de la concentration de phalloïdine sur la dénaturation thermique de l'actine F. La concentration d'actine F est de 3 mg/ml et la vitesse de balayage de 40°C/h. Les valeurs dans les rectangles indiquent le rapport molaire phalloïdine:actine.

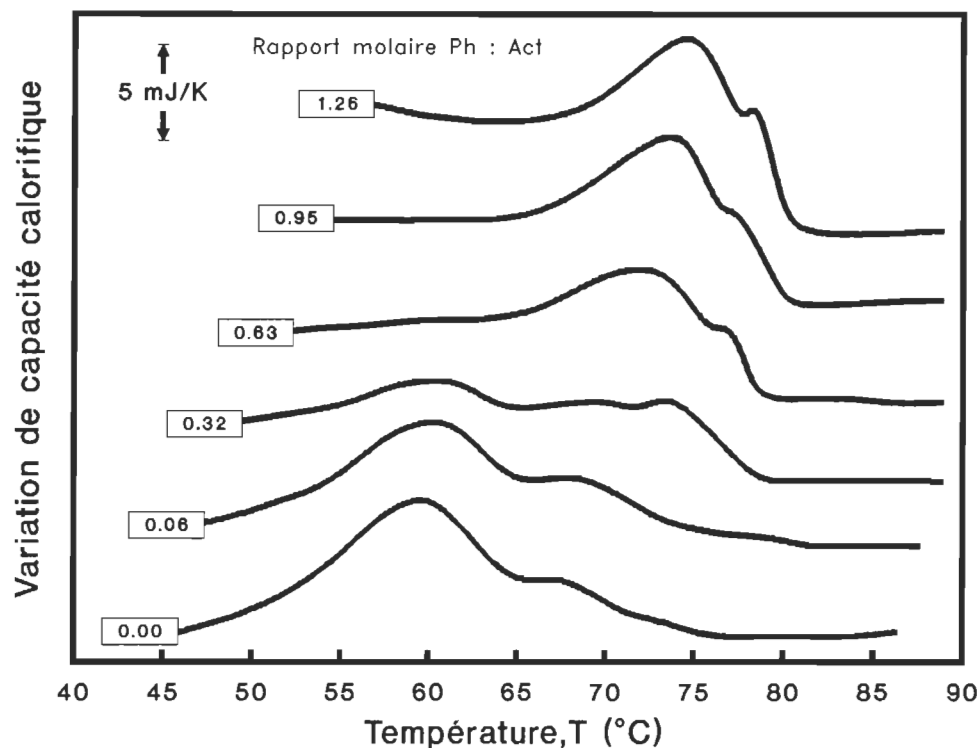
Pour des rapports molaires phalloïdine:actine supérieurs ou égaux à 0.37, la température de transition est quasi constante de l'ordre de 82°C. L'effet le plus marqué est obtenu à des rapports molaires phalloïdine:actine se situant entre 0.02 et 0.37 alors que la température de transition varie de 69 à 82°C. A de faibles rapports molaires (0.02 à 0.37), les transitions thermiques sont fortement modifiées par la présence de la phalloïdine. Ces modifications consistent principalement en un élargissement de la transition vers des températures plus élevées et l'apparition d'un épaulement vers 80°C dont l'amplitude augmente au détriment du pic vers 70°C. A des rapports molaires phalloïdine:actine voisins de l'unité, l'effet de la phalloïdine est maximal, et un excès de phalloïdine ne modifie pas appréciablement le tracé calorimétrique. La dénaturation de l'actine F reste irréversible même en présence de phalloïdine.

**Commentaires :** L'examen de la figure 29 montre plusieurs aspects qui peuvent être soulignés. Le comportement du complexe phalloïdine-actine pour des rapports molaires intermédiaires (0.02 à 0.37) est trop complexe pour être modélisé car la présence d'un épaulement secondaire peut être l'indice de la présence de populations intermédiaires. Les formes des transitions obtenues à des rapports molaires voisins de l'unité sont plus simples et sont modélisées dans la section 5.32. L'actine F saturée en phalloïdine, en plus de montrer une thermostabilité accrue, montre également une meilleure symétrie qu'en absence de phalloïdine. Cette amélioration de la symétrie par ajout de phalloïdine serait l'indice d'une augmentation de l'ordre de réaction.

#### *ii) Effet de la phalloïdine sur la thermostabilité de l'actine G*

**Résultats:** La figure 30 montre des thermogrammes de dénaturation thermique de l'actine G en présence de différentes concentrations de phalloïdine. En absence de phalloïdine, la transition thermique de l'actine G est caractérisée par une transition majeure à 59.5°C. Le léger épaulement perceptible à 68°C même en absence de phalloïdine est attribué à la présence d'une certaine quantité d'actine F étant donné que cet épaulement coïncide avec la température de transition de l'actine F. En présence de phalloïdine, l'amplitude de la transition à 59.5°C diminue rapidement au profit de l'épaulement secondaire. Au-delà d'un rapport molaire de 0.63, l'effet

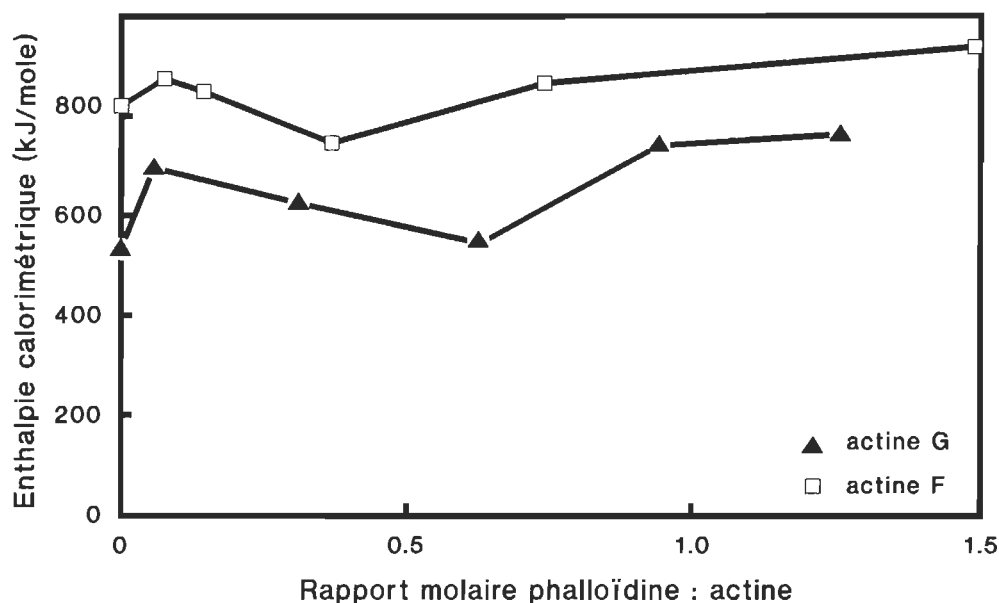
d'une augmentation de phalloïdine est moins perceptible et la température de transition se stabilise au voisinage de 75°C; une transition secondaire apparaît à 78.5°C. La présence de phalloïdine ne modifie pas l'irréversibilité de la transition thermique de l'actine G.



**Figure 30:** Effet de la concentration de phalloïdine sur la dénaturation thermique de l'actine G. La concentration d'actine G est de 3 mg/ml et la vitesse de balayage de 40°C/h. Les valeurs dans les rectangles indiquent le rapport molaire phalloïdine:actine.

**Commentaires:** La figure 30 illustre clairement que la dénaturation thermique de l'actine G est modifiée par la présence de phalloïdine. Toutefois aucun rapport molaire phalloïdine:actine n'a fourni des tracés suffisamment simples pour permettre l'application des approches cinétiques détaillées au chapitre 4. Le léger épaulement associé à la présence d'actine F a amené des modifications au protocole, soit l'introduction d'une centrifugation supplémentaire afin d'éliminer l'éventuelle présence de formes filamenteuses dans les solutions d'actine G.

L'influence du rapport molaire phalloïdine:actine sur l'enthalpie calorimétrique de la dénaturation thermique est montrée à la figure 31 pour les deux types d'actine. Cette influence est à toutes fins pratiques peu significative.



**Figure 31:** Effet de la concentration de phalloïdine sur l'enthalpie calorimétrique associée à la dénaturation thermique de l'actine G et F. Les transitions thermiques considérées sont celles des figures 29 et 30.

### 5.32 Étude quantitative de l'interaction

Il a été impossible de trouver une méthode isothermale simple permettant d'évaluer les paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine. Seule la calorimétrie différentielle à balayage a permis de mesurer ces paramètres. L'étude quantitative de la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine pour des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité permet de clarifier certains aspects de la dénaturation thermique de l'actine F.

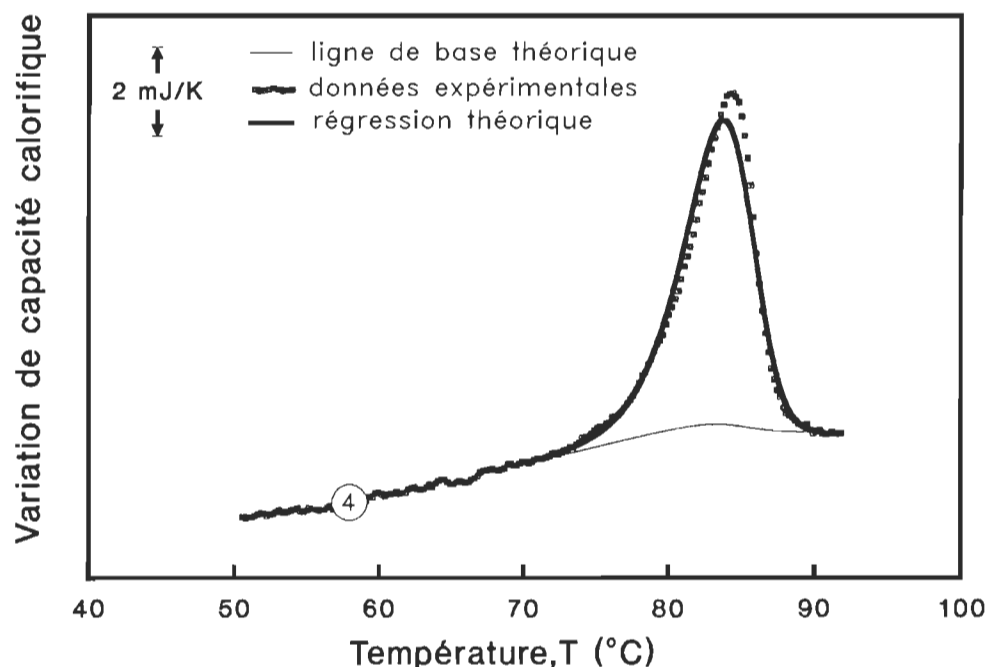
Dans cette section, les paramètres cinétiques sont obtenus à l'aide des mêmes

techniques que celles utilisées pour l'actine F en l'absence de phalloïdine et décrites au chapitre 4. Les résultats de cette section ont tous été obtenus avec un calorimètre différentiel à balayage Hart 7707.

Les paramètres cinétiques  $E_a$ ,  $\ln(\xi)$  et  $n$  ont été évalués de la même façon qu'en absence de phalloïdine (partie 5.2). La procédure a consisté à considérer un intervalle qui optimise l'estimateur  $\sigma_\epsilon^2$ .

i) *Méthode du thermogramme simple*

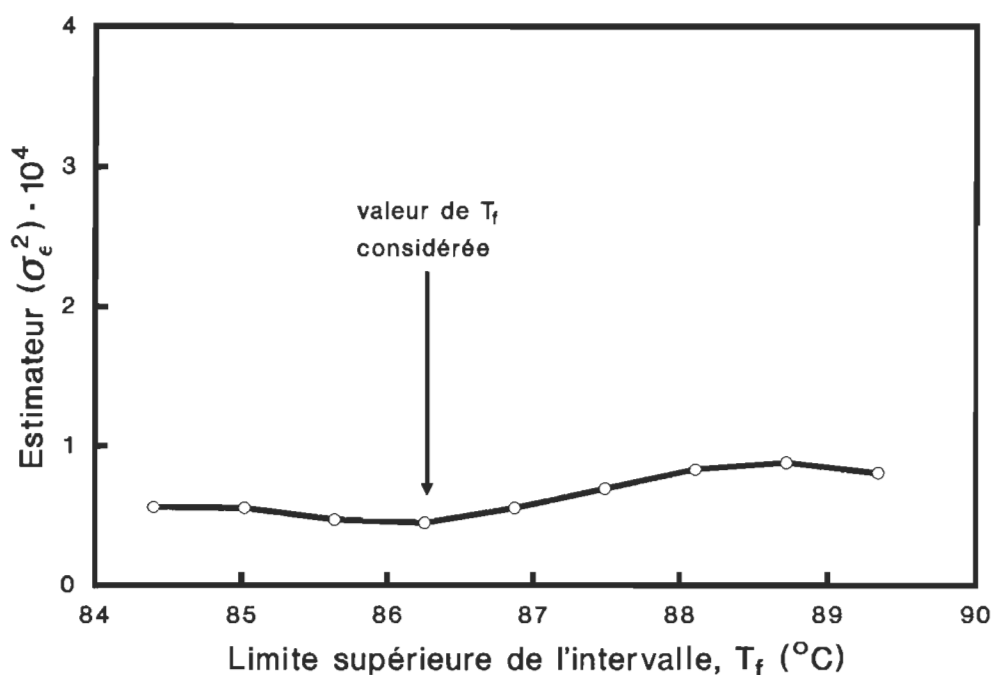
**Résultats:** La figure 32 illustre la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine dans un rapport molaire proche de l'unité. La concentration de l'actine est de 3.55 mg/ml. La transition est irréversible et la température de transition est de 84.4°C pour une vitesse de balayage de 37.47°C/h.



**Figure 32:** Tracé calorimétrique associé à la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine à des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité. La concentration d'actine est de 3.55 mg/ml et la vitesse de balayage est de 37.47°C/h. La courbe en continue est obtenue à partir de l'équation [41] et la ligne de base provient de l'application de l'équation [61].

L'enthalpie calorimétrique est environ de 1000 kJ/mole pour un rapport coopératif de 0.74. La ligne de base a été évaluée de la même façon que pour l'actine G et F en utilisant l'équation [61]. L'évaluation des paramètres cinétiques pour décrire le phénomène s'est effectuée avec la méthode matricielle détaillée au chapitre 4 à l'item 4.12 ii. Une simulation du phénomène est effectuée avec les paramètres cinétiques obtenus par l'équation [41]. Cette simulation se réfère à un modèle binaire irréversible d'ordre n. Le choix des paramètres cinétiques a été déterminé au niveau du tableau 9 et est associé à une valeur minimale de l'estimateur  $\sigma_\epsilon^2$  pour l'intervalle caractérisé par la température finale ( $T_f$ ).

Le graphique de la figure 33 montre la relation entre l'estimateur, évalué à partir de l'équation [50], et la température finale de l'intervalle utilisé pour cette régression. Les mêmes échelles en ordonnée, que dans le cas de l'actine F, ont été utilisées (figure 26), montrant ainsi que l'intervalle considéré ne modifie que très peu la qualité de la régression.



**Figure 33:** Graphique illustrant l'optimisation de l'intervalle par la relation entre la température finale et l'estimateur. Données calorimétriques provenant de la figure 32.

Les valeurs utilisées pour la simulation de l'équation [41] sur la figure 32 correspondent à une température finale de 86.25°C, l'énergie d'activation évaluée est de 491 kJ/mole, l'ordre du mécanisme selon le tableau 9 est indépendant de la valeur de la température finale considérée (en caractère gras au tableau 9).

**Commentaires:** La qualité de la régression illustrée à la figure 33 montre bien que la température finale ne modifie que très peu la valeur de l'estimateur. Il est probable que la dénaturation thermique de l'actine F, en présence de phalloïdine, peut être décrite (du moins pour la plage de température considérée ici) par des lois cinétiques. Cette observation est valable pour les ordres (n) voisins ou supérieurs à l'unité. Le tableau 9 montre que cet ordre oscille effectivement entre 1.1 et 1.3. Tous les paramètres cinétiques illustrés au tableau 9 sont peu influencés par la valeur de la température finale ( $T_f$ ) considérée.

**Tableau 9**

Estimation des paramètres cinétiques en fonction de l'intervalle critique considéré: cas de l'actine F en présence de phalloïdine.

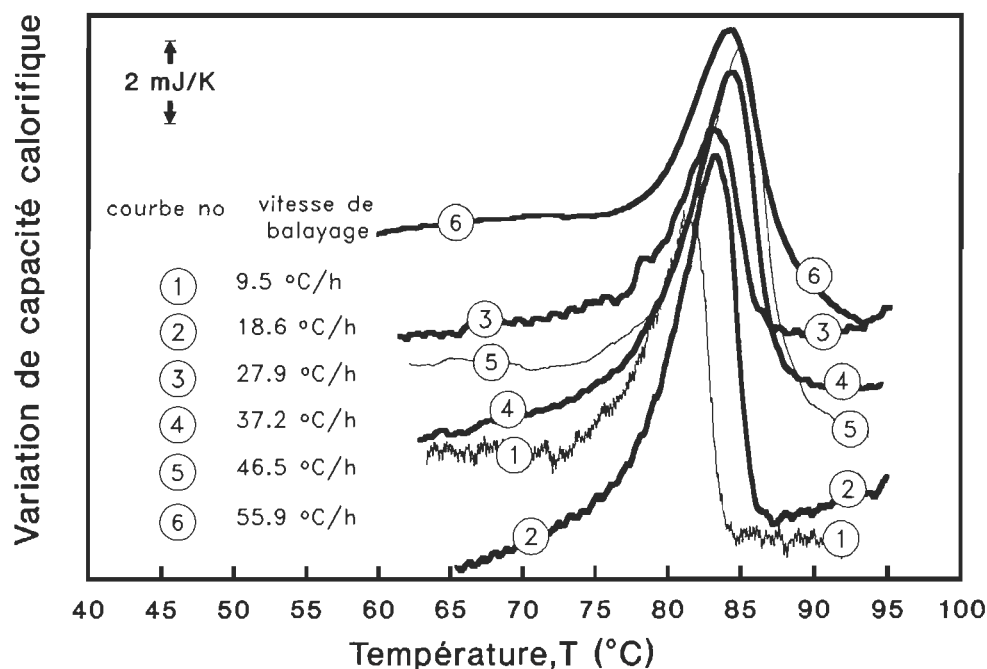
$T_f$ °C	Ea kJ/mole	$\ln(\xi/s^{-1})$	n	$\sigma_\epsilon^2 \cdot 10^5$
89.34	503	164.123	1.198	8.07
88.72	504	164.568	1.207	8.81
88.11	502	163.888	1.190	8.31
87.49	498	162.508	1.152	6.94
86.87	494	161.182	1.110	5.56
<b>86.25</b>	<b>491</b>	<b>160.139</b>	<b>1.071</b>	<b>4.49</b>
85.64	492	160.245	1.076	4.71
85.02	496	161.837	1.165	5.57
84.40	504	164.464	1.343	5.63

L'évaluation de ces paramètres a été effectuée sur le tracé calorimétrique de la figure 32 pour une température initiale  $T_i$  de l'intervalle  $[T_i, T_f]$  de 70.97°C.



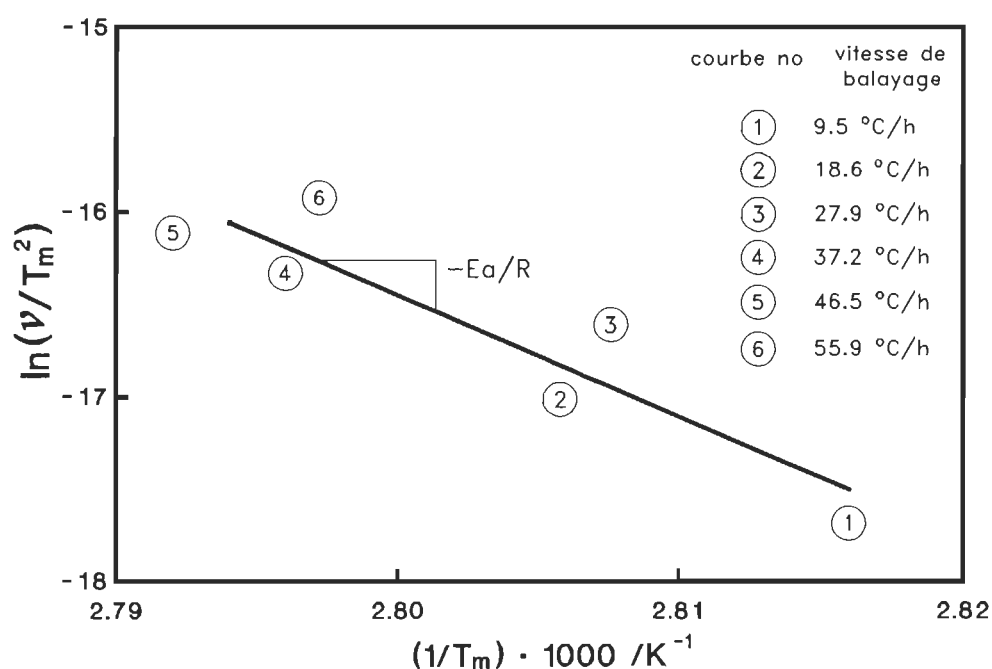
## ii) Méthode des thermogrammes multiples

**Résultats:** La figure 34 montre l'effet de la vitesse de balayage ( $v$ ) sur la transition thermique de l'actine F en présence de phalloïdine à des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité. La concentration d'actine est de 3.55 mg/ml. L'augmentation de la vitesse de balayage produit une hausse de la température de transition. Les paramètres cinétiques  $E_a$  et  $\ln(A)$  sont évalués par une régression linéaire  $\ln(v/T_m^2)$  vs  $1/T_m$  selon l'équation [16] détaillée par Sanchez-Ruiz, J.M. et al (1988) et est illustrée à la figure 35. Les thermogrammes considérés sont ceux de la figure 34. L'énergie d'activation évaluée à l'aide de cette méthode est de 545 kJ/mole.



**Figure 34:** Effet de la vitesse de balayage sur la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine à des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité. Les concentrations d'actine F sont de 3.55 mg/ml. Les vitesses de balayage sont indiquées dans la partie gauche de la figure.

**Commentaires:** Cette dépendance de la température de transition ( $T_m$ ) envers la vitesse de balayage ( $\nu$ ) est caractéristique des phénomènes sous contrôle cinétique. Il semble qu'avec les deux méthodes (soit avec un seul tracé calorimétrique, soit à l'aide de plusieurs tracés calorimétriques), les paramètres cinétiques sont du même ordre de grandeur contrairement au cas de l'actine F sans phalloïdine où la différence entre les deux méthodes d'évaluation était plus importante (tableau 8). La comparaison entre les paramètres cinétiques évalués par les deux méthodes est présentée au tableau 10.



**Figure 35:** Relation entre la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine F en présence de phalloïdine à des rapports molaires phalloïdine:actine proches de l'unité, et la vitesse de balayage ( $\nu$ ). La détermination des paramètres cinétiques ( $E_a$  et  $\ln(A)$ ) a été effectuée à partir d'une régression linéaire de  $\ln(\nu/T_m^2)$  versus  $1/T_m$  selon l'équation [16]. Les données de base proviennent des thermogrammes de la figure 34.

**Tableau 10**

Paramètres cinétiques de la dénaturation thermique de l'actine F en présence de phalloïdine évalués à l'aide de différentes méthodes.

Technique	Ea kJ/mole	$\ln(\xi/s^{-1})$ ou $\ln[A \cdot s \cdot (\text{mg/ml})^{(n-1)}]$
<i>Thermogramme simple (D.S.C.)</i> n = 1.071 ± 0.002	491 ± 30	$\ln(\xi)^1$ 160.1 ± 0.1
<i>Thermogrammes multiples (D.S.C.)</i> n non évalué	545 ± 100	$\ln(A)$ 178.5 ± 0.1
1	Étant donné que l'ordre n de la dénaturation est proche de l'unité, la valeur de $\ln(\xi)$ est voisine de $\ln(A)$ .	

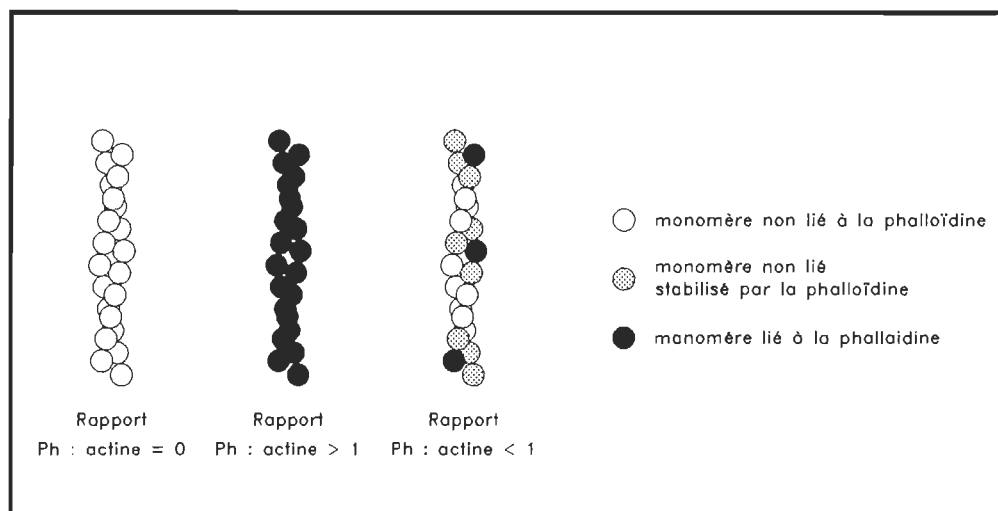
### 5.33 Modèle proposé de l'effet thermostabilisant de la phalloïdine sur l'actine

L'utilisation de la phalloïdine pour l'étude de la dénaturation thermique de l'actine s'est avérée un outil fort utile pour cerner certains aspects de la dénaturation thermique de l'actine. Cette étude a également permis de mieux comprendre l'interaction entre l'actine et la phalloïdine.

La polymérisation de l'actine monomérique induite par les sels (2 mM  $\text{MgCl}_2$  + 100 mM KCl) produit la forme filamenteuse de l'actine. L'actine F montre une thermostabilité plus élevée que la forme monomérique. Ceci peut s'expliquer par le fait que les interactions entre les monomères augmenteraient la thermostabilité du filament. Ces résultats sont confirmés par les études de A. Bertazzon *et al* (1990).

En présence de fortes concentrations de phalloïdine, le filament est beaucoup plus thermostable, et contrairement à l'actine F seule, le filament saturé en phalloïdine se dénature selon une cinétique d'ordre 1 (les ordres fractionnaires peuvent être un indice d'une fragmentation lors de la dénaturation). Ce dernier point confirmerait, dans une certaine mesure, que la dépolymérisation ou la fragmentation de l'actine F en présence de phalloïdine est très réduite (Coluccio, L.M. et Tilney, L.G., 1984).

L'étude de la dénaturation thermique de l'actine F à des rapports molaires phalloïdine:actine inférieurs à l'unité montrent que, non seulement le monomère d'actine directement lié à la molécule de phalloïdine est thermostabilisé, mais que les monomères voisins et non directement liés sont aussi protégés. La figure 29 confirme, dans une certaine mesure, cette observation par l'étalement de la transition vers les températures élevées pour des rapports molaires phalloïdine:actine de 0.02 à 0.37. La figure 36 schématise l'effet thermostabilisant de la phalloïdine sur le filament d'actine. Sachant que la structure filamenteuse thermostabilise le monomère d'actine, on peut suggérer que, si certains monomères qui composent le filament sont plus thermostabilisés que les autres à cause de la phalloïdine, le reste du filament en sera affecté.



**Figure 36:** Schéma illustrant l'effet thermostabilisant de la phalloïdine sur le filament d'actine.

Concernant l'actine G, l'interprétation est nettement plus complexe. Nos résultats montrent que l'actine G est protégée contre la dénaturation thermique par l'ajout de phalloïdine ce qui laisse penser à une interaction possible entre la phalloïdine et l'actine G. Cette interprétation serait toutefois en désaccord avec des études antérieures qui ont montré que la phalloïdine n'interagit qu'avec la forme F de l'actine (De Vries, I. *et al*, 1976). Une explication plausible serait que l'augmentation progressive de la température en calorimétrie différentielle à balayage

induit la polymérisation de l'actine qui est alors capable de se lier à la phalloïdine. L'épaulement à 67°C sur la figure 30 est possiblement associé à la présence d'actine F. Cet épaulement à 67°C associé à la présence d'actine F prend de l'importance avec l'augmentation de la concentration de phalloïdine. La hausse lente de température, pouvant induire une polymérisation de l'actine serait la cause principale de l'interaction entre l'actine G et la phalloïdine.

#### **5.4 Synthèse des observations**

L'ensemble des résultats et observations obtenus sur les différents types d'actine, à l'aide de plusieurs techniques, permet certaines réflexions générales concernant la dénaturation thermique de l'actine.

##### **5.41 Actine G**

La dénaturation thermique de l'actine G semble obéir à des lois cinétiques simples. L'actine G se dénature de façon irréversible sous contrôle cinétique.

Les résultats obtenus à l'aide d'une méthode isothermale (variation d'intensité de fluorescence intrinsèque), montrent plusieurs caractéristiques des phénomènes cinétiques. La figure 15 a montré que l'ordre de dénaturation est voisin de l'unité car la cinétique de dénaturation est indépendante de la concentration (équation [54]). La dépendance de la constante de vitesse ( $k_{app}$ ) envers la température peut être décrite par une loi d'Arrhénius comme illustré à la figure 16. L'énergie d'activation ainsi obtenue est d'environ 230 kJ/mole.

Les courbes obtenues par calorimétrie différentielle à balayage, montrent aussi que la dénaturation thermique de l'actine G est sous dépendance cinétique. La courbe en continu de la figure 17 est associée à une transition binaire irréversible (équation [30]). Cette solution numérique est plus satisfaisante que celle de Bertazzon, A. *et al* (1990) illustrée à la figure 7 et basée sur une approche purement thermodynamique (équation [9]).

Une autre caractéristique des phénomènes sous dépendance cinétique est la

relation entre la température de transition ( $T_m$ ) et la vitesse de balayage ( $v$ ) illustrée à la figure 19. Cette dépendance de la température de transition de l'actine G envers la vitesse de balayage est observée sur les données provenant d'autres auteurs mais n'a pas fait l'objet d'une étude publiée. La figure 6 montre bien cette relation dans un espace d'Arrhénius.

De plus, les paramètres cinétiques  $E_a$  et  $\ln(A)$  obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (soit la variation de la capacité calorifique versus la température) sont du même ordre de grandeur que les paramètres cinétiques obtenus par fluorescence. Cette similitude des paramètres cinétiques semble confirmer que la dénaturation de l'actine G est bien décrite par chacune des techniques.

Des trois types d'actine (actine G, actine F et actine F en présence de fortes concentrations de phalloïdine) pour une vitesse de balayage donnée, la température de transition ( $T_m$ ) de l'actine G est la plus faible.

#### 5.42 Actine F

La dénaturation thermique de l'actine F semble aussi obéir à des lois cinétiques mais celles-ci sont plus complexes. Tout comme l'actine G, l'actine F se dénature de façon irréversible sous contrôle cinétique.

La complexité du phénomène de la dénaturation thermique de l'actine F est en majorité causée par un ordre  $n$  de dénaturation probablement inférieur à l'unité. Cette observation est confirmée par une méthode isothermale et par calorimétrie différentielle à balayage. Les résultats obtenus par fluorescence montrent qu'il y a un effet de la concentration d'actine F sur sa dénaturation thermique, effet qui est montré à la figure 21. A l'aide de la relation entre le temps de demi-vie et la concentration initiale d'actine ( $\ln(t_{1/2})$  vs  $\ln[N]_0$ ) illustré à la figure 22, la valeur de l'ordre  $n$  est évaluée à 0.61. L'effet de la température sur la vitesse de dénaturation de l'actine F est similaire à celui de l'actine G. A l'aide d'un graphique d'Arrhénius illustré à la figure 24, la valeur d'énergie d'activation oscille entre 245 et 260 kJ/mole.

La régression effectuée sur le tracé calorimétrique de la figure 25 fournit une valeur d'ordre  $n$  se situant à 0.68, valeur qui est comparable à celle obtenue avec la méthode isothermale. Toutefois, l'énergie d'activation évaluée à partir d'un seul tracé calorimétrique est de 390 kJ/mole, valeur supérieure à celle obtenue précédemment par la méthode isothermale. Toujours par calorimétrie différentielle à balayage, l'énergie d'activation évaluée, à partir de plusieurs thermogrammes, est de 255 kJ/mole, une valeur qui est du même ordre de grandeur que celle obtenue par la méthode isothermale.

La signification d'un ordre de dénaturation inférieur à l'unité n'est pas évidente à concevoir. Une valeur fractionnaire de l'ordre indique probablement que le filament d'actine se fragmente ou dépolymérise lors de sa dénaturation thermique. Il est donc possible, comme dans le cas de la flagelline, que le taux de dépolymérisation augmente à température élevée (Oosawa, F. et Asakura, S., 1975) ce qui serait une des causes d'un ordre de dénaturation inférieur à l'unité. Toutefois, en faisant abstraction de la signification physique d'un ordre ( $n$ ) inférieur à l'unité celui-ci peut être interprété comme n'étant qu'un facteur de forme.

Les valeurs des paramètres cinétiques évaluées à l'aide d'un seul thermogramme sont plus élevées par rapport aux autres techniques. L'énergie d'activation évaluée par cette méthode est de 390 kJ/mole. Mis à part cette dernière valeur de l'énergie d'activation, on remarque que dans le cas de l'actine G et F, on a une valeur d'énergie d'activation du même ordre de grandeur, voisin de 250 kJ/mole. Pour une même vitesse de balayage, l'actine F va se dénaturer à plus haute température que l'actine G. La forme filamenteuse confère donc à l'actine une thermostabilité plus élevée, comparée à l'actine G.

#### 5.43 Actine en présence de phalloïdine

Le choix de la phalloïdine comme outil d'étude de la dénaturation thermique de l'actine a permis de cerner certains aspects de la dénaturation thermique.

La modification des thermogrammes d'actine G en présence de phalloïdine a été surprenante car aucune étude antérieure n'a mis en évidence une interaction

entre la phalloïdine et l'actine G. Cette modification peut être interprétée par une double influence de la phalloïdine. Premièrement, la présence de phalloïdine va diminuer la concentration critique de l'actine, et deuxièmement, l'augmentation lente de la température va induire une polymérisation partielle de l'actine, d'où interaction possible entre l'actine F ainsi formée et la phalloïdine. Avec cette hypothèse, les résultats obtenus en calorimétrie différentielle à balayage sont biaisés, car la hausse lente de la température modifie l'état de la protéine avant sa dénaturation thermique, la phalloïdine favoriserait dans ce cas la forme filamenteuse au détriment de la forme globulaire qui peut alors interagir avec la phalloïdine.

Contrairement à Miyamoto, Y. *et al* (1986), la calorimétrie différentielle à balayage montre que la thermostabilité optimale est obtenue à un rapport molaire phalloïdine:actine proche de l'unité et non pas de 0.5. L'effet thermostabilisant est évident, à une vitesse de balayage donnée, le filament d'actine saturé en phalloïdine a une température de transition supérieure d'environ 10 à 15°C à la température de transition de l'actine F sans phalloïdine. Par contre, à faible rapport molaire phalloïdine:actine, on peut admettre qu'il y a trois types d'actine; des monomères d'actine F directement liés à la phalloïdine, des monomères non liés à la phalloïdine mais qui subissent indirectement l'effet thermostabilisant de la phalloïdine et finalement des monomères d'actine simplement thermostabilisés par la forme filamenteuse seule. La figure de principe 36 illustre cet effet.

Des tracés calorimétriques de la figure 29 et ceux des figures 32 et 34, on peut faire une observation intéressante; l'actine filamenteuse saturée en phalloïdine est associée à une transition simple (c'est-à-dire qui ne comporte pas de transition secondaire ou étalement de pic) contrairement à l'actine F non saturée en phalloïdine (figure 29). Une analyse quantitative des tracés calorimétriques de l'actine F saturée en phalloïdine montre que la transition est d'ordre 1. Des paramètres cinétiques du même ordre de grandeur sont obtenus, que ce soit à l'aide d'un seul thermogramme ( $E_a = 491$  kJ/mole), ou à l'aide de la relation entre la température de transition et la vitesse de balayage ( $E_a = 545$  kJ/mole). Cette valeur de l'énergie d'activation est le double de celle obtenue avec l'actine F et l'actine G sans phalloïdine.



Alors que l'ordre de la dénaturation thermique de l'actine filamenteuse sans phalloïdine est inférieur à l'unité, un ordre de dénaturation voisin de l'unité est observé pour l'actine saturée en phalloïdine. Il est possible que le filament d'actine saturé en phalloïdine ne dépolymérisera ou fragmentera moins avant sa dénaturation thermique. Une des propriétés de la phalloïdine est justement de réduire le taux de dépolymérisation de l'actine.

Étant donné que la phalloïdine se lie entre les deux sous-unités de l'actine (Hegyi, G. *et al*, 1986) et qu'il en résulte une augmentation considérable de la thermostabilité de l'actine, on peut en déduire que cette région, entre les deux sous-unités, est critique dans la dénaturation thermique de cette protéine. Dans le même ordre d'idée, la présence d'un ion divalent entre les deux sous-unités de l'actine est quasi-essentiel à la structure compacte de l'actine (Bertazzon, A. *et al*, 1990).

### **5.5 Signification des paramètres cinétiques**

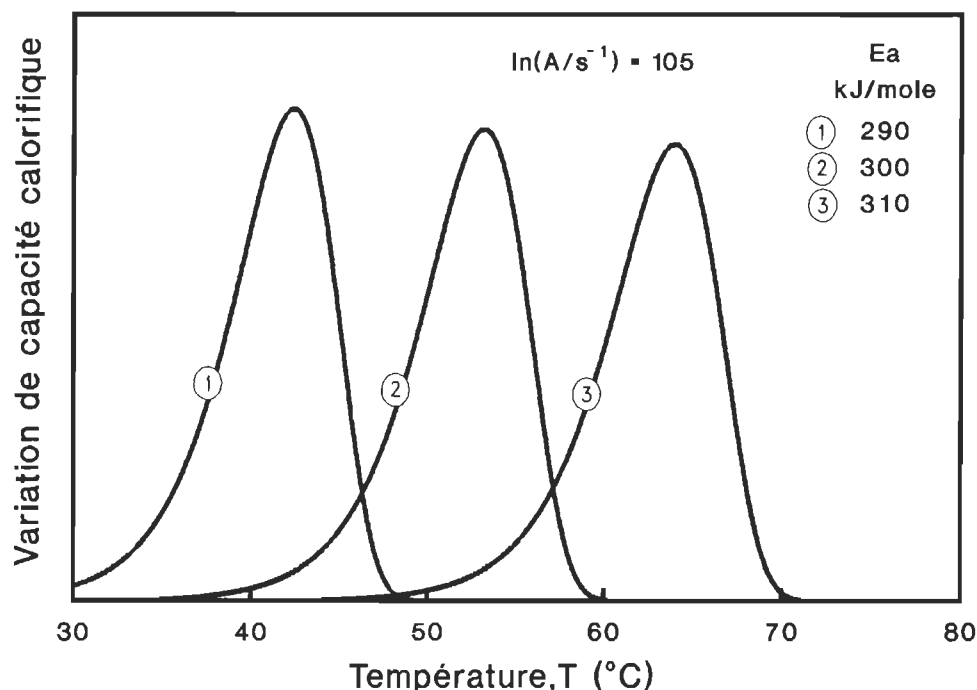
On peut s'interroger, entre autre, sur la signification réelle, moléculaire, des paramètres cinétiques tels l'énergie d'activation ( $E_a$ ), le paramètre de collision ( $\ln(A)$ ), l'ordre ( $n$ ) de dénaturation, dans le cas de la transition irréversible d'une protéine. La plupart des études axées sur la signification de ces paramètres ont souvent été effectuées avec des modèles beaucoup plus simples que des protéines en solution, et il peut être hasardeux de prétendre qu'un parallèle direct soit possible entre ces modèles simples et les protéines.

Il ne semble pas qu'il y ait de lien clairement établi entre les paramètres cinétiques évalués et les paramètres thermodynamiques régissant la première étape de la dénaturation (schématisé par l'équation [10]). Une relation entre la quantité de chaleur associée à la transition thermique ( $\Delta H_{cal}$  par exemple) et les paramètres cinétiques précédemment mentionnés est sûrement possible, mais pas clairement établie.

La quantification, ou l'évaluation des paramètres qui déterminent la transition irréversible de protéines est assez récente et ne remonte qu'en 1988 (Sanchez-Ruiz, J.M. *et al*, 1988), si on exclut le travail préliminaire effectué par R. Lumry et Eyring,

H., (1954). Il en résulte que peu d'auteurs ont tenté d'expliquer la signification de ces paramètres cinétiques. De façon très succincte et à l'aide de simulation de l'équation [30], on peut commenter qualitativement l'effet des paramètres cinétiques sur la forme de la transition et leur signification plausible:

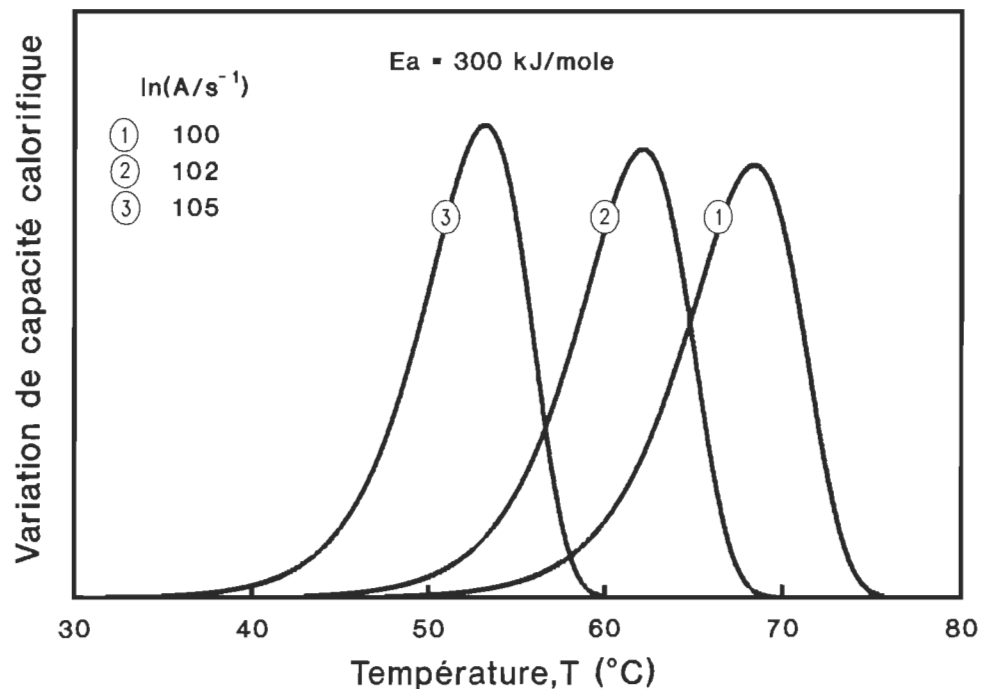
- 1- Plus l'énergie d'activation  $E_a$  est élevée, plus la réaction va s'effectuer à haute température, c'est ce qui est simulé à la figure 37. L'énergie d'activation dans ce cas peut être associée à une barrière énergétique que doit surmonter l'état natif pour atteindre l'état dénaturé. Le peuplement des niveaux énergétiques supérieurs peut se faire en augmentant simplement la température du milieu.



**Figure 37:** Figure de principe illustrant l'effet de la variation de l'énergie d'activation sur une simulation de thermogramme tout en conservant les autres paramètres constants. Simulation effectuée avec l'équation [30] pour un  $\nu = 0.011$  K/s.

- 2- Plus le facteur de collision  $A$  est élevé, pour une même valeur d'énergie d'activation, plus la température de transition est basse, c'est ce qui est

simulé à la figure 38. La signification de ce facteur dans le cas de la dénaturation irréversible des protéines est moins claire que pour l'énergie d'activation. Certains auteurs préfèrent exprimer autrement ce facteur. Par exemple, Sanchez-Ruiz, J.M., (1992) utilise à la place de ce facteur un terme dépendant d'une température caractéristique ( $T^*$  associé à une valeur de  $k_{app}$  égal à l'unité). Selon la théorie cinétique des gaz, un facteur de collision élevé peut signifier que l'état final est moins ordonné que l'état initial ou que l'orientation des réactifs entre eux est peu important (Latham, J.L. et Burgess, A.E., 1977).



**Figure 38:** Figure de principe illustrant l'effet de la variation du facteur de collision sur une simulation de thermogramme tout en conservant les autres paramètres constants. Simulation effectuée avec l'équation [30] pour un  $\nu = 0.011$  K/s.

- 3- L'ordre de dénaturation joue principalement sur la symétrie de la transition. Plus la valeur de l'ordre ( $n$ ) est inférieure à l'unité, plus la transition sera asymétrique avec une pente plus abrupte après la température de transition  $T_m$ . Cette évolution de la forme de la transition a été simulée à la figure 13.

Pour des valeurs de  $n$  supérieur à 1, l'asymétrie sera prononcée mais inversée et continue par rapport au cas précédent avec une pente plus abrupte avant la température de transition,  $T_m$ . Pour des ordres  $n$  supérieurs ou égal à l'unité, il n'y a pas de discontinuité dans la relation  $\Delta C_p$  vs  $T$ . Des transitions symétriques semblent être possibles pour des ordres d'environ 1.4 à 1.6.

La signification des paramètres cinétiques évalués à partir de transitions thermiques de protéines reste peu précise compte tenu de la complexité des phénomènes mis en jeu. Toutefois, de façon globale, ces paramètres nous permettent de prédire, dans des conditions bien spécifiques, certains comportements jusqu'alors imprévisibles de quelques protéines .

## CONCLUSIONS

La dénaturation thermique de l'actine a fait l'objet d'un intérêt croissant au cours des dernières années. Le déploiement de cette protéine sous l'effet de la chaleur a été observé à l'aide de plusieurs techniques dont: la fluorescence (Lehrer, S. et Kerwar, G., 1972; Ikeuchi, Y. *et al*, 1990), la viscosimétrie (Ikeuchi, Y. *et al*, 1990), la mesure de l'activité ATPasique (Ikeuchi, Y. *et al*, 1990) et le D.S.C. (Bertazzon, A. *et al*, 1990; Tatunashvili, L.V. et Privalov, P.L., 1984; Fausnaugh, J.L. *et al*, 1984; Le Bihan, T. et Gicquaud, C., 1991). Parmi ces techniques, le D.S.C. offre un grand avantage car il permet la mesure directe de paramètres thermodynamiques impliqués au cours de la transition ainsi que la mise en évidence de domaines coopératifs dans la protéine.

Comme mentionné auparavant, le bilan des travaux antérieurs sur l'actine révèle d'importantes différences sur les paramètres mesurés ainsi que sur les mécanismes de dénaturation proposés par différents auteurs (Bertazzon, A. *et al*, 1990; Tatunashvili, L.V. et Privalov, P.L., 1984; Contaxis, C.C. *et al*, 1977). La différence la plus importante est la température de transition de l'actine G qui varie de 45°C à 80°C selon les auteurs (Ikeuchi, Y. *et al*, 1990; Bertazzon, A. *et al*, 1990; Le Bihan, T. et Gicquaud, C., 1991; Tatunashvili, L.V. et Privalov, P.L., 1984; Fausnaugh, J.L. *et al*, 1984).

Or, ces différents auteurs interprètent leurs résultats à l'aide de modèles d'équilibre thermodynamique. Cette approche avait été antérieurement utilisée avec succès pour l'étude de protéines particulières dont la dénaturation thermique obéit à des phénomènes d'équilibre thermodynamique (Privalov, P.L., 1979). Cependant, la dénaturation thermique de nombreuses protéines et de l'actine en particulier, est un phénomène irréversible et l'application des lois qui régissent les systèmes réversibles ne nous paraît pas toujours appropriée, même si cette approche est considérée comme applicable par certains auteurs (Hu, C. Q. et Sturtevant, J., 1987; Manly, S.P. *et al*, 1985). Quelques études ont toutefois montré qu'il était possible de caractériser, à l'aide d'une approche thermodynamique, la dénaturation irréversible de certaines protéines, lorsque la température de transition n'est pas affectée par la vitesse de balayage (Lohner, K. et Esser, A.F., 1991).

Une meilleure caractérisation des phénomènes thermiques impliqués lors de la dénaturation thermique de l'actine nécessite donc une approche nouvelle. Dans cette optique, la présente étude est axée sur l'utilisation de l'approche cinétique pour tenter de mieux préciser le comportement thermique de différentes formes de l'actine.

La dénaturation thermique de l'actine G est un phénomène cinétique qui peut être décrit par des lois cinétiques simples tel, un ordre de dénaturation égal à l'unité et que la constante de vitesse  $k_{app}$  varie en fonction de la température selon une loi d'Arrhénius. Nous avons mesuré des paramètres cinétiques qui étaient du même ordre de grandeur et ce, à l'aide de deux techniques complètement différentes soit: par calorimétrie ainsi que par fluorescence.

Concernant l'actine F, l'interprétation des résultats est plus complexe et certaines divergences quant à la valeur de paramètres ont été observées surtout au niveau de la valeur de l'énergie d'activation  $E_a$  et du facteur de collision pondéré  $\ln(\xi)$ . La complexité de l'interprétation des résultats provient d'un ordre de dénaturation fractionnaire dont une des conséquences évidentes est la relation entre la concentration initiale d'actine F et son temps de demi-vie. Cette relation entre le temps de demi-vie et la concentration (qui découle d'un ordre de dénaturation fractionnaire) est associée à un phénomène de fragmentation.

En présence de phalloïdine, cette fragmentation est réduite et est reflétée par des ordres de dénaturation proches de l'unité. L'interaction entre la forme globulaire de l'actine et la phalloïdine serait due en grande partie à une baisse de la concentration critique de l'actine associée à la fois à l'augmentation de température et à la présence de la phalloïdine elle même.

Il est également possible d'expliquer certaines lacunes expérimentales de plusieurs auteurs ayant étudié la dénaturation de l'actine par une interprétation cinétique. Les différentes températures de transition de l'actine G peuvent être expliquées par l'influence de la vitesse de balayage qui est différente d'un auteur à un autre. La forme asymétrique des transitions associées à la dénaturation thermique de l'actine G et F de Bertazzon, A. *et al* (1990) obtenue par D.S.C. peut

être aussi mieux expliquée à l'aide d'une approche cinétique.

De plus, l'irréversibilité de la dénaturation thermique n'est pas contraignante dans une approche cinétique et de ce fait, la caractérisation de la transition thermique de l'actine G et F à l'aide d'une approche d'équilibre thermodynamique n'est pas justifiée.

En bref, l'analyse de nos résultats obtenus par fluorescence et par D.S.C. nous a montré que la dénaturation thermique de l'actine correspond davantage à une transition irréversible sous contrôle cinétique qu'à un processus obéissant à un modèle d'équilibre thermodynamique. Cette conclusion peut être sûrement élargie à d'autres protéines dont la caractérisation de la dénaturation thermique est ambiguë et suscite un besoin d'outils mathématiques pour traiter ce type de transition.

La maîtrise de l'application de l'approche cinétique et thermodynamique combinées permet, entre autre, la caractérisation d'une plus grande gamme de transitions thermiques ainsi qu'une réflexion plus réaliste de l'acquisition d'informations pertinentes découlant de ces transitions.

## RÉFÉRENCES

- Arnold, M., Veress, G.E., Paulik, J., et Paulik, F., "Problems of the characterization of thermoanalytical process by kinetic parameters, part 1", J. Thermal Anal., 1979, 17, 507-528.
- Bastos, M., Hägg, S., Lönnbro, P. et Wadsö I., "Fast titration experiments using heat conduction microcalorimeters", J. Biochem. Biophys. Methods, 1991, 23, 255-258.
- Bertazzon, A., Tian, G.H., Lamblin, A. et Tsong, T.Y., "Enthalpic and entropic contribution to actin stability: Calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium", Biochemistry, 1990, 29, 291-298.
- Brandts, J.F. et Lin, L.N., "Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry", Biochemistry, 1990, 29, 6927-6940.
- Brown, A., Régression et corrélation, Notes de cours , Faculté des sciences de l'administration, Université de Laval, Ste-Foy, 1975.
- Capellos, C. et Bielski, B.H., Kinetic system; Mathematical description of chemical kinetics in solution, New-York, Ed. Wiley-interscience, 1972.
- Chang, L.H., Li, S.J., Ricca, T.L. et Marshall, A.G., "Theoretical and experimental one-line analysis of multistate melting of polymers by differential scanning microcalorimetry", Anal. Chem., 1984, 56, 1502-1507.
- Coluccio, L.M. et Tilney, L.G., "Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation", J. Cell Biol., 1984, 99, 529-535.
- Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Aviles, F.X. et Sanchez-Ruiz, J.M., "Effect of  $Zn^{2+}$  on the thermal denaturation of carboxypeptidase B", Biochemistry, 1991, 30, 2067-2072.
- Contaxis, C.C., Bigelow, C.C. et Zarkaas, C.G., "The thermal denaturation of bovine cardiac G-actin", Can. J. Biochem., 1977, 55, 325-331.



Cooper, J.A., "Effect of cytochalasin and phalloidin on actin", J. Cell Biol., 1987, 105, 1473-1478.

Creighton, T.E., "Le repliement des protéines", La Recherche, 1991, 22, 312-323.

Dancker, P., Löw, W., Hasselbach, W. et Wieland, Th., "Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin", Biochim. Biophys. Acta, 1975, 400, 407-414.

De Vries, I, Schäfer, A.J., Faulstich, H. et Wieland, Th., "Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, 357, 1139-1143.

De Vries, I. et Wieland, Th., "Influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin", Biochemistry, 1978, 17, 708-712.

Fausnaugh, J.L., Blazyk, J.F., El Saleh, S.C. et Johnson, P., "Calorimetric studies on monomeric and polymeric actin" Experientia, 1984, 40, 83-84.

Freire, E., Murphy, K.P., Sanchez-Ruiz, J.M., Galisteo, M.L. et Privalov, P.L., "The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in Phosphoglycerate Kinase", Biochemistry, 1992, 31, 250-256.

Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. et Sanchez-Ruiz, J.M., "Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins", Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1990, 19, 159-188.

Galisteo, M.L., Mateo, P.L. et Sanchez-Ruiz, J.M., "Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of yeast phosphoglycerate kinase", Biochemistry, 1991, 30, 2161-2066.

Hegyi, G., Szilagyi, L. et Elzinga, M., "Photoaffinity labeling of the nucleotide binding site of actin", Biochemistry, 1986, 25, 5793-5798.

Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W. et Kabsch, W., "Atomic model of the actin filament", Nature, 1990, 347, 44-49.

Hu, C.Q. et Sturtevant, J.M., "Thermodynamic study of yeast phosphoglycerate kinase" Biochemistry, 1987, 26, 178-182.

Ikeuchi, Y., Ito, T., Fukazawa, T., "A kinetic analysis of thermal denaturation of F-actin", Int. J. Biochem., 1981, 13, 1065-1069.

Ikeuchi, Y., Iwamura, K. and Suzuki, A., "Heat denaturation of rabbit skeletal G-actin in the presence of ATP", J. Food Sci., 1990, 50, 287-296.

Jacobson, G.R. et Rosenbusch, J.P., "ATP binding to a protease-resistant core of actin", Proc. Natl. Acad. Sci., 1976, 73, 2742-2746.

Johnson, M. L., et Faunt, L.M. "Parameter estimation by least-squares methods", Methods Enzymol., 1992, 210, 1-37.

Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. et Holmes, K. "Atomic structure of the actin:DNAse I complex", Nature, 1990, 347, 37-44.

Kabsch, W. et Vandekerckhove, J. "Structure and function of actin", Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1992, 21, 49-76.

Kasai, M., Asakura, S. et Oosawa, F., "The G-F equilibrium in actin solutions under various conditions", Biochim. Biophys. Acta, 1962, 57, 13-21.

Kessler, H. et Wein, T., "Solution structure of phalloidin obtained by NMR spectroscopy in [D<sub>6</sub>]DMSO and Molecular Dynamics calculation in vacuo and in water", Liebigs Ann. Chem., 1991, 179-184.

Korn, E., "Actin polymerization and its regulation by proteins from non muscle cells" Physiol. Rev., 1982, 62, 2, 672-737

Kuznetsova, I.M., Khaitlina, S.Y., Konditerov, S.N., Surin, A.M. et Tureverov, K.K., "Changes of structure and intramolecular mobility in the course of actin denaturation", Biophys. Chem., 1988, 32, 73-78.

Laidler, K.J. Chemical kinetics, Ed. Laidler, K.J., New-York, Toronto, London, McGraw-Hill Book Company, inc, 1950.

Latham, J.L. et Burgess, A.E. Elementary reaction kinetics, Ed. Butterworth, London, 1977.

Le Bihan T. et Gicquaud, C., "Stabilization of actin by phalloidin: a differential scanning calorimetric study", Biochem. Biophys. Res. Comm., 1991, 181, 542-547.

Lehrer, S. et Kerwar, G., "Intrinsic fluorescence of Actin", Biochemistry, 1972, 11, 1211-1217.

Leroux, P. Algèbre linéaire, une approche matricielle, Ed. Leroux, P., Ville Mont-Royal, Québec: Modulo, 1983.

Lohner, K. et Esser, A., "Thermal unfolding and aggregation of human complement protein C9: A differential scanning calorimetry study", Biochemistry, 1991, 30, 6620-6625.

Löw, I., Dancker, P. et Wieland, Th., "Stabilization of F-actin by phalloidin. Reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B." FEBS Lett., 1975, 54, 263-265.

Lumry, R. et Eyring, H., "Conformation changes of proteins", J. Phys. Chem., 1954, 58, 110-120

Manly, S.P., Matthews, K.S. et Sturtevant, J.M., "Thermal denaturation of the core protein of *lac* repressor", Biochemistry, 1985, 24, 3842-3846.

Miyamoto, Y., Kuroda, E., Munekata, E. et Masaki, T., "Stoichiometry of actin and phalloidin binding: one molecule of the toxin dominates two actin subunits", J. Biochem. (Tokyo), 1986, 100, 1677-1680.

Oosawa, F. et Asakura, S., "Thermodynamics of the polymerization of protein", Molecular Biology. An international series of monograph and textbooks, 1975, Ed. New York, London, Academic Press.

Pardee, J. et Spudich, J., "Structural and contractile proteins (Part B: the contractile apparatus and the cytoskeleton)", Methods Enzymol., 1982, 85, 164-181.

Pollender, J. et Gruda, J., "Effect of phalloidin on actin proteolysis as measured by viscometry and fluorimetry", Can. J. Biochem., 1979, 57, 49-55.

Privalov, P.L. "Stability of protein", Adv. Prot. Chem., 1979, 33, 167-241.

Privalov, P.L., et Gill, S.J., "Stability of protein structure and hydrophobic interaction", Adv. Prot. Chem., 1988, 39, 191-234.

Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S.Y., Griko, Y.V., Makhatadze, G.I. et Khechinashvili, N.N., "Heat capacity and conformation of proteins in the denaturated state", J. Mol. Biol., 1989, 205, 737-750.

Ramsay, G. et Freire, E., "Linked thermal and solute perturbation analysis of cooperative domain interaction in proteins. Structural stability of diphtheria toxin", Biochemistry, 1990, 29, 8677-8683.

Ross, P.D. et Goldberg, R.N. "A scanning microcalorimeter for thermally induced transitions in solution", Thermochimica Acta, 1974, 10, 143-151.

Sampath, P. et Pollard, T.D., "Effect of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filament", Biochemistry, 1991, 30, 1973-1980.

Sanchez-Ruiz, J.M., "Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry", Biophys. J., 1992, 61, 921-935.

Sanchez-Ruiz, J.M., Lopez-Lacomba, J.L., Cortijo, M., et Mateo, P.L., "Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin", Biochemistry, 1988, 27, 1648-1652.

Sano, T., Noguchi, S.F., Matsumoto, J.J. et Tsuchiya, T., "Dynamic Viscoelastic behavior of F-actin on heating", J. Food Sc., 1989, 54, 231-232.

Schwarz, F.P., "Biological thermodynamic data for the calibration of differential scanning calorimeters: Heat capacity data on the unfolding transition of lysozyme in solution", Thermochimica Acta, 1989, 147, 71-91.

Schäfer, A., De Vries, J.X., Faulstich, H. et Wieland, Th., "Phalloidin counteracts the inhibitory effect of actin on deoxyribonuclease I", FEBS Lett., 1975, 57, 51-54.

Tatunashvili, L.V. et Privalov, P.L., "Calorimetric investigation of G-actin denaturation", Biofizika, 1984, 29, 583-585.

Takahashi, K. et Sturtevant, J.M., "Thermal denaturation of streptomyces subtilisin inhibitor, subtilisin BPN', and the inhibitor-subtilisin complex" Biochemistry, 1981, 20, 6185-6190.

Thelestam, M. et Gross, R., Handbook of Toxinology (chapitre 6), Ed. W.T. Shier et D. Mebs Marcel Dekker Inc., New York et Basel, 1990.

Turcotte, A., "Séparation des virotoxines du champignon *Amanita virosa* et étude de leurs interactions sur l'actine *in vitro*". Mémoire de maîtrise en Biophysique, Université du Québec, 1982.

Valentin-Ranc, C. et Carlier, M.-F., "Role of ATP-bound divalent metal ion in the conformation function of actin", J. Biol. Chem., 1991, 266, 7668-7675.

Wendel, H. et Dancker, P., "Kinetics of actin depolymerization: influence of ions, temperature, age of F-actin, cytochalasin B and phalloidin", Biochim. Biophys. Acta, 1986, 873, 387-396.

Wetzel, R., Perry, L.J., Mulkerrin, M.G. et Randall, M., Unfolding and inactivation. Genetic and chemical approaches to the stabilization of T4 lysozyme and human interferon Gamma against irreversible thermal denaturation. Chap. 5, In J.B. Hook et G. Poste (Eds), Protein design and the development of new therapeutics and vaccines. Plenum Publishing Corporation, 1990, pp.79-115.

Wieland, Th., Peptides of poisonous Amanita Mushrooms, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Alexander Rich, 1986.

Yocum, R.R. et Simon, D.M., "Amatoxins and phallotoxins in *Amanita* species of the North Eastern United States", Lloydia, 1977, 40, 178-190.

## Annexe A

Relation entre la température de transition et la vitesse de balayage pour des ordres de dénaturation différents de l'unité.

La relation entre la température de transition,  $T_m$ , et la vitesse de balayage,  $v$ , a été démontrée par Sanchez-Ruiz, J.M. *et al*, (1988) pour un ordre de dénaturation égal à l'unité. Toutefois, il n'a pas été clairement établi, dans le passé, que cette relation était semblable pour des ordres  $n$  différents de l'unité. Nous présentons en premier lieu, le cas classique soit lorsque l'ordre  $n$  est égal à l'unité et par la suite le deuxième cas (ordre  $n$  différent de l'unité). Il sera alors plus simple de faire certains parallèles entre les deux cas.

**ordre 1:** Par définition, la température de transition  $T_m$ , est la température à laquelle la variation de la capacité calorifique est maximale d'où  $d(\Delta C_p)/dT = 0$  et par analogie  $d(d\alpha/dT)/dT = 0$  selon la relation [6]. Une transition thermique simple d'ordre 1 peut être facilement ramenée à la relation [24] (voir section 4.12 Méthodes de régression):

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \cdot (1 - \alpha) \quad [A1]$$

à  $T = T_m$ :

$$\frac{d'\alpha}{dT^2} = \frac{d}{dT} \left[ \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \cdot (1 - \alpha) \right] = 0 \quad [A2]$$

$$\frac{d'\alpha}{dT^2} = \frac{A}{v} \left[ \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \frac{Ea}{RT_m^2} \cdot (1 - \alpha) - \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \frac{d\alpha}{dT} \right] = 0 \quad [A3]$$

En remplaçant la valeur de  $d\alpha/dT$  de [A3] par celle provenant de [A1], on obtient:

$$\left[ \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \frac{Ea}{RT_m^2} \cdot (1 - \alpha) - \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \cdot (1 - \alpha) \right] = 0 \quad [A4]$$

L'élimination des termes communs de l'équation [A4] fournit:

$$\left[ \frac{Ea}{RT_m^2} - \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \right] = 0 \quad [A5]$$

$$\frac{Ea}{RT_m^2} = \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \quad [A6]$$

On peut linéariser la dépendance entre la température de transition et la vitesse de balayage comme l'a effectué Sanchez-Ruiz, J.M. *et al*, (1988).

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{Ea} \exp\left(\frac{-Ea}{RT_m}\right) \quad [A7]$$

La pente du graphique  $\ln(v/T_m^2)$  vs  $1/T_m$  est une valeur constante:

$$\ln\left(\frac{v}{T_m^2}\right) = \ln\left(\frac{AR}{Ea}\right) - \frac{Ea}{R} \frac{1}{T_m} \quad [A8]$$

$$\frac{d\ln\left(\frac{v}{T_m^2}\right)}{d\left(\frac{1}{T_m}\right)} = - \frac{Ea}{R} \quad [A9]$$



Donc, pour un ordre  $n$  égal à l'unité, la pente de la relation  $\ln(v/T_m^2)$  vs  $1/T_m$  est constante et vaut  $-E_a/R$ .

**ordre  $n$ :** Le développement est similaire au cas précédent. L'équation de départ est l'équation [40] dont l'équation [24] est un cas particulier:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \cdot (1-\alpha)^n \quad [A10]$$

à  $T = T_m$ :

$$\frac{d'\alpha}{dT^2} = \frac{d}{dT} \left[ \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \cdot (1-\alpha)^n \right] = 0 \quad [A11]$$

$$\frac{\xi}{v} \left[ \exp\left(\frac{-E_a}{RT_m}\right) \frac{E_a}{RT_m^2} \cdot (1-\alpha)^n - \exp\left(\frac{-E_a}{RT_m}\right) n(1-\alpha)^{(n-1)} \frac{d\alpha}{dT} \right] = 0 \quad [A12]$$

En remplaçant la valeur de  $d\alpha/dT$  de [A12] par celle provenant de [A10] on obtient:

$$\left[ \exp\left(\frac{-E_a}{RT_m}\right) \frac{E_a}{RT_m^2} \cdot (1-\alpha)^n - \exp\left(\frac{-E_a}{RT_m}\right) n(1-\alpha)^{(n-1)} \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT_m}\right) (1-\alpha)^n \right] = 0 \quad [A13]$$

L'élimination des termes communs de l'équation [A13] fournit:

$$\frac{E_a}{RT_m^2} = n(1-\alpha)^{(n-1)} \frac{\xi}{v} \exp\left(\frac{-E_a}{RT_m}\right) \quad [A14]$$

La valeur de  $\alpha$  à  $T_m$  peut se définir comme  $\alpha_m$

$$\frac{v}{T_m^2} = \left( \frac{\xi R}{Ea} \right) n (1 - \alpha_m)^{(n-1)} \exp \left( \frac{-Ea}{RT_m} \right) \quad [A15]$$

$$\ln \left( \frac{v}{T_m^2} \right) = \ln \left( \frac{\xi R n}{Ea} \right) + (n-1) \ln(1 - \alpha_m) - \frac{Ea}{R} \frac{1}{T_m} \quad [A16]$$

$$\frac{d \ln \left( \frac{v}{T_m^2} \right)}{d \left( \frac{1}{T_m} \right)} = \frac{d}{d \left( \frac{1}{T_m} \right)} \left[ \ln \left( \frac{\xi R n}{Ea} \right) + (n-1) \ln(1 - \alpha_m) - \frac{Ea}{R} \frac{1}{T_m} \right] \quad [A17]$$

Si  $\alpha_m$  est constant donc indépendant de  $T_m$  et de  $v$  alors:

$$\frac{d \ln \left( \frac{v}{T_m^2} \right)}{d \left( \frac{1}{T_m} \right)} = - \frac{Ea}{R} \quad [A18]$$

Si  $\alpha_m$  dépend de la vitesse de balayage ( $v$ ) ou de la température de transition ( $T_m$ ), alors:

$$\frac{d \ln \left( \frac{v}{T_m^2} \right)}{d \left( \frac{1}{T_m} \right)} = (n-1) \frac{d \ln(1 - \alpha_m) T_m^2}{dT_m} - \frac{Ea}{R} \quad [A19]$$

Si il existe une relation entre  $\alpha_m$  et la température de transition,  $T_m$ , alors la pente de

la relation  $\ln(v/T_m^2)$  vs  $1/T_m$  n'est pas constante et vaut:

$$(n-1) \frac{d \ln(1-\alpha_m) T_m^2}{dT_m} - \frac{E_a}{R} \quad [A20]$$

Une analyse numérique des transitions montre que pour une plage réaliste de coefficients donnés soit environ:  $E_a \approx 250$  kJ/mole,  $\ln(\xi) \approx 80$  et  $n \approx 0.6$ , la valeur de  $\alpha_m$  est indépendante de la température de transition pour des vitesses de balayage se situant entre 10 et 80 °C/h. Il semble à priori envisageable que  $\alpha_m$  soit indépendant pour une plage de coefficients beaucoup plus larges.

De plus, pour la plage de paramètres considérés,  $\alpha_m$  demeure assez voisin de 0.5 et il est donc évident que le terme  $(n-1)\ln(1-\alpha_m)$  de l'équation [A16] qui est de l'ordre de 0.3 est négligeable vis-à-vis du terme  $\ln(\xi R n/E_a)$  qui a une valeur se situant entre 70 et 80.

## Annexe B

### Données brutes

titre: effet de la température sur la dénaturation de l'actine G													
comment. données brutes de la figure 15													
fichier: IANNE01				tempér.: variable									
date: 10-12 aout 1991				conc.: 0.05 mg/ml									
				échelle Y: *64									
A :	1ère série			2ème série			3ème série			4ème série			
	70.777			72.53			69.6			69.88			
	24.6			25.589			29.6			27.42			
	0.0300			0.0637			0.0088			0.0145			
no	temps	tempér.: 55.5 C			tempér.: 58.5 C			tempér.: 51.5 C			tempér.: 54.5 C		
	min	I320	I320	F%	I320	I320	F%	I320	I320	F%	I320	I320	F%
		expér.	théor.		expér.	théor.		expér.	théor.		expér.	théor.	
1	0	89.8	95.4	0.77	98.6	98.1	1.02	98.5	99.2	0.98	97.8	97.3	1.02
2	3												
3	5	92.5	92.0	0.88									
4	6				89.2	90.0	0.65						
5	8										94.3	94.3	0.89
6	9				87.3	87.0	0.58						
7	10	89.3	89.0	0.75									
8	12				84.2	84.4	0.46						
9	13							97.2	96.0	0.93			
10	15	86.3	86.5	0.63									
11	16										91.3	91.6	0.78
12	18				79.9	80.7	0.29						
13	20	83.5	84.3	0.52									
14	24				78.3	78.1	0.23						
15	26							93.8	93.2	0.82	88.3	88.7	0.67
16	30	79.9	80.8	0.37	76.3	76.3	0.15						
17	32										87.2	87.1	0.63
18	34							91.6	91.6	0.74			
19	36				75.9	75.1	0.13						
20	40	78.2	78.2	0.30									
21	42				75.2	74.3	0.10						
22	48				74.1	73.7	0.06				83.6	83.6	0.50
23	50	76.4	76.3	0.23									
24	52							87.5	88.4	0.60			
25	60	74.8	74.8	0.16	73.0	73.1	0.02						
26	64										80.9	80.7	0.40
27	70	75.8	73.8	0.20									
28	72				72.5	72.8	-0.00						
29	80	72.3	73.0	0.06				81.3	84.3	0.46	77.3	78.5	0.27
30	87				72.7	72.6	0.01						
31	96										77.5	76.7	0.28
32	100	72.6	72.0	0.07									
33	104							81.3	81.5	0.40			
34	105				71.5	72.6	-0.04						
35	112										76.8	75.3	0.25
36	126	71.8	71.3	0.04									
37	130							79.6	79.1	0.34	72.6	74.0	0.10
38	150	71.3	71.1	0.02									
39	160							77.8	76.9	0.28	73.3	72.6	0.12
40	181	69.2	70.9	-0.06									
41	185							75.3	75.4	0.19			
42	192										71.8	71.6	0.07
43	212							73.5	74.2	0.13			
44	224										71.4	70.9	0.06
45	260							73.7	72.6	0.14			
46	315							71.8	71.5	0.07	69.3	70.2	-0.02
47	364							70.3	70.8	0.02			
48	455							69.8	70.1	0.01			

titre: effet de la concentration sur la dénaturation de l'actine G																					
comment. données brutes de la figure 16																					
fichier:		IANNEX02										tempér.:		55.5°C							
date:		31 juillet 1991										conc.:		variable							
												échelle Y:		variable							
A : B : k :		1ère série sln2a				2ème série sln2b				3ème série sln 2c				4ème série sln3				5ème série sln4			
		1.4665				0.9358				0.4822				74.67				39.679			
		0.5175				0.3584				0.2				30.987				14.14			
		0.0200				0.0182				0.0241				0.0191				0.0190			
no	temps min	concent.: 0.0652 mg/ml				concent.: 0.0417 mg/ml				concent.: 0.0209 mg/ml				concent.: 3.26 mg/ml				concent.: 1.63 mg/ml			
		I320 expér.	Inorm expér.	F% expér.	F% théor.	I320 expér.	Inorm expér.	F% expér.	F% théor.	I320 expér.	Inorm expér.	F% expér.	F% théor.	I320 expér.	Inorm expér.	F% expér.	F% théor.	I320 expér.	Inorm expér.	F% expér.	F% théor.
1	0	63.5	1.9844	1.00	1.00	83.5	1.30	1.03	1.00	87.5	0.68	1.01	1.00	47.5	74.2	-0.01	1.00	45.0	35.2	-0.32	1.00
2	12	59.5	1.8594	0.76	0.79	78.5	1.23	0.81	0.80	80.5	0.63	0.73	0.75	63.5	99.2	0.79	0.80	64.0	50.0	0.73	0.80
3	20	58.7	1.8344	0.71	0.67	75.3	1.18	0.67	0.69	77.5	0.61	0.62	0.62	61.3	95.8	0.68	0.68	64.8	50.6	0.77	0.68
4	30	56.2	1.7563	0.56	0.55	72.3	1.13	0.54	0.58	74.5	0.58	0.50	0.49	59.4	92.8	0.59	0.56	61.0	47.7	0.56	0.57
5	45	53.8	1.6813	0.41	0.41	70.3	1.10	0.45	0.44	70.2	0.55	0.33	0.34	62.3	97.3	0.73	0.42	58.4	45.6	0.42	0.43
6	60	51.6	1.6125	0.28	0.30	66.4	1.04	0.28	0.34	67.5	0.53	0.23	0.24	53.5	83.6	0.29	0.32	56.5	44.1	0.32	0.32
7	110	50.2	1.5688	0.20	0.11	64.0	1.00	0.18	0.14	65.9	0.51	0.16	0.07	50.8	79.4	0.15	0.12	52.8	41.3	0.11	0.12
8	120	48.3	1.5094	0.08	0.09	64.6	1.01	0.21	0.11	65.8	0.51	0.16	0.06	51.9	81.1	0.21	0.10	54.6	42.7	0.21	0.10
9	130	48.8	1.525	0.11	0.07	63.7	1.00	0.17	0.09	58.6	0.46	-0.12	0.04	49.5	77.3	0.09	0.08	51.5	40.2	0.04	0.08
10	155	47.8	1.4938	0.05	0.05	60.3	0.94	0.02	0.06	62.8	0.49	0.04	0.02	49.3	77.0	0.08	0.05	52.5	41.0	0.09	0.05
11	180	48.3	1.5094	0.08	0.03	62.5	0.98	0.11	0.04	63.7	0.50	0.08	0.01	47.6	74.4	-0.01	0.03	51.6	40.3	0.04	0.03
12	225	47.2	1.475	0.02	0.01	60.6	0.95	0.03	0.02	62.8	0.49	0.04	0.00	48.9	76.4	0.06	0.01	51.2	40.0	0.02	0.01
13	255	45.7	1.4281	-0.07	0.01	58.8	0.92	-0.05	0.01	61.3	0.48	-0.02	0.00	58.3	91.1	0.53	0.01	64.8	50.6	0.77	0.81
14	300	46.2	1.4438	-0.04	0.00	57.3	0.90	-0.11	0.00	60.8	0.48	-0.04	0.00	47.9	74.8	0.01	0.00	50.2	39.2	-0.03	0.00
15	330	48.3	1.5094	0.08	0.00	60.8	0.95	0.04	0.00	65.8	0.51	0.16	0.00	47.2	73.8	-0.03	0.00	51.3	40.1	0.03	0.00
échelle en ordonnée; ech		32				64				128				64				128			
concentr de dénatur.; Cd		0.0652				0.0417				0.0209				3.2600				1.6300			
concentr. de mesure (1); Cm		0.0652				0.0417				0.0209				0.0326				0.0163			
La fonction est évaluée par nfit																					
F% correspond au pourcentage de la protéine native $F\% = (I320(\text{expér.}) - A) / B$																					
$I320 \text{ norm.} = (I320(\text{expér.}) * Cd) / (Cm * ech)$																					

(1): mesure effectuée en diluant 100 X (0.1ml/10ml)

titre: eff. de la tempé sur dénat. de l'act. G							
comment. données nécessaires de la figure 17							
fichier:		1ANNEX03			tempér variable		
date:		23 juillet 91			conc.: 0.0439 mg/ml		
éch Y: *64							
A : B : k :		1ère série			2ème série		
		69.81			71.87		
		29.34			29.44		
		0.048			0.05		
no	temps min	tempér.: 59 C			tempér.: 59 C		
		I320 expér.	I320 théor.	F%	I320 expér.	I320 théor.	F%
1	0	100.0	99.15	1.03	101.6	*****	1.01
2	2	97.2	96.47	0.93	100.3	98.52	0.97
3	4	94.3	94.04	0.83	96.5	96.00	0.84
4	6	91.8	91.83	0.75	93.0	93.72	0.72
5	8	88.3	89.83	0.63	90.3	91.65	0.63
6	10	86.6	88.00	0.57	87.8	89.78	0.54
7	15	82.8	84.13	0.44	84.6	85.84	0.43
8	20	80.8	81.09	0.37	82.8	82.77	0.37
9	25	79.8	78.69	0.34	81.9	80.37	0.34
10	30	78.8	76.80	0.31	79.8	78.50	0.27
11	40	75.4	74.15	0.19	77.0	75.90	0.17
12	50	73.2	72.50	0.12	74.9	74.32	0.10
13	60	70.8	71.48	0.03	73.5	73.36	0.06
14	70	69.2	70.84	-0.02	72.6	72.78	0.02
15	85	rien	rien	rien	70.5	72.30	-0.05
16	105	70.0	70.00	0.01	rien	rien	rien



titre: effet de la tempér. sur la dénaturation de l'actine G										
comment. données brutes nécessaires pour la figure 17										
fichier: 1ANNEX04			tempér.: variable							
date: 25 juillet 1991			conc.: 0.0468 mg/ml							
			échelle Y: *32							
A :	1ère série			2ème série			3ème série			
	36.02			37.48			39.18			
	16.4			16.14			12.4			
B :	0.002			0.006			0.022			
k :										
no	temps	tempér.: 45.5 C			tempér.: 49.5 C			tempér.: 55.5 C		
	min	I320	I320	F%	I320	I320	F%	I320	I320	F%
		expér.	théor.		expér.	théor.		expér.	théor.	
1	0	52.2	52.42	0.99	53.6	53.62	1.00	50.8	51.58	0.94
2	2							50.2	51.04	0.88
3	4				50.5	53.24	0.81	48.3	50.52	0.73
4	6							46.5	50.03	0.59
5	8				49.5	52.86	0.74	45.2	49.56	0.48
6	10	52.9	52.18	1.03				43.9	49.11	0.38
7	12				48.3	52.50	0.67			
8	15							42.3	48.07	0.25
9	16				47.9	52.14	0.65			
10	20	51.9	51.94	0.97	46.6	51.80	0.57	41.4	47.13	0.18
11	25				46.2	51.38	0.54	41.0	46.30	0.14
12	30	51.5	51.70	0.94	45.1	50.97	0.47	39.9	45.55	0.06
13	40				44.4	50.18	0.43	38.5	44.28	-0.05
14	45	51.5	51.35	0.94						
15	50				43.7	49.45	0.39	37.5	43.26	-0.14
16	60	50.5	51.01	0.88	42.8	48.75	0.33	36.8	42.45	-0.20
17	70							36.3	41.80	-0.23
18	75				41.9	47.79	0.27			
19	80	50.5	50.57	0.88						
20	85							35.3	41.06	-0.32
21	90				41.3	46.90	0.24			
22	100	50.2	50.14	0.86						
23	120	49.8	49.72	0.84	39.7	45.36	0.14			
24	150	49.2	49.12	0.80	39.2	44.06	0.11			
25	180	48.9	48.54	0.79						
26	210	48.4	47.99	0.75						
27	240	47.2	47.46	0.68						
28	300	45.9	46.48	0.60						
29	360	45.9	45.58	0.60						

titre: effet de la température sur la dénaturation de l'actine G													
comment. données brutes nécessaire pour la figure 17													
fichier:		1ANNEX05						tempér.:		variable			
date:		21-22 aout 1991						conc.:		0.045 mg/ml			
								échelle Y:		*64			
A : B : k :		1ère série			2ème série			3ème série			4ème série		
		57.586			57.342			58.235			57.93		
		9.1667			19.757			11.404			18.899		
		0.008			0.0037			0.0339			0.0267		
no	temps min	tempér.: 53.5 C			tempér.: 47.5 C			tempér.: 57 C			tempér.: 55 C		
		I320 expér.	I320 théor.	F%	I320 expér.	I320 théor.	F%	I320 expér.	I320 théor.	F%	I320 expér.	I320 théor.	F%
1	0	66.8	66.8	1.01	76.3	77.1	0.96	69.5	69.6	0.99	76.6	76.8	0.99
2	3							68.8	68.5	0.93			
3	5										75.3	74.5	0.92
4	6							67.3	67.5	0.79			
5	8	66.6	66.2	0.98									
6	9							66.5	66.6	0.72			
7	10										72.8	72.4	0.79
8	12							66.2	65.8	0.70			
9	15										70.3	70.6	0.65
10	16	65.6	65.7	0.87									
11	18							64.3	64.4	0.53			
12	20				76.3	75.7	0.96				68.2	69.0	0.54
13	24							63.6	63.3	0.47			
14	25	64.6	65.1	0.77									
15	30							62.6	62.4	0.38	65.8	66.4	0.42
16	33	53.8	64.6	-0.42									
17	34												
18	36							60.8	61.6	0.22			
19	40				75.2	74.4	0.90						
20	42							61.3	61.0	0.27	64.2	64.1	0.33
21	48	63.7	63.8	0.67				60.3	60.5	0.18			
22	50										62.8	62.9	0.26
23	60				73.3	73.2	0.81	59.6	59.7	0.12	61.3	61.7	0.18
24	64	63.5	63.1	0.65									
25	75							59.2	59.1	0.08	61.3	60.5	0.18
26	80	62.7	62.4	0.56	72.3	72.1	0.76				60.9	60.1	0.16
27	81												
28	95							59.2	58.7	0.08			
29	96	62.3	61.9	0.51									
30	100										59.8	59.2	0.10
31	105							58.9	58.6	0.06			
32	112	61.3	61.3	0.41									
33	120				69.6	70.1	0.62	57.8	58.4	-0.04	59.6	58.7	0.09
34	128	60.5	60.9	0.32									
35	150										57.9	58.3	-0.00
36	153	59.8	60.3	0.24									
37	160				67.8	68.3	0.53						
38	175										56.3	58.1	-0.09
39	181	59.9	59.8	0.25									
40	185												
41	200	59.8	59.5	0.24	66.2	66.9	0.45						
42	224	59.2	59.1	0.18									
43	240				65.3	65.6	0.40						
44	246	58.7	58.9	0.12							58.3	58.0	0.02
45	293				64.3	64.1	0.35						
46	320				63.6	63.5	0.32						
47	380				63.2	62.3	0.30						
48	440				61.6	61.3	0.22						
49	500				61.6	60.5	0.22						
50	560				58.3	59.9	0.05						



titre: Principaux paramètres mesurés par variation d'intensité de fluorescence												
commentaire données brutes des études de la variation d'intensité de fluorescence de l'actine G												
fichier: IANNEX06 synthèse des fichiers Iannex01-Iannex05												
effet mesuré	nom des fichier	conc mg/ml	tempér C	A	DA	B	DB	k min-1	Dk min-1	chi car	R sqr	coef of
tempéra	1-25juil	0.0468	45.5	36.02	8.18	16.40	8.06	1.5E-03	9.5E-03	0.1428	1.0000	
tempéra	2-25juil	0.0468	49.5	37.48	2.90	16.14	2.80	6.0E-03	1.6E-03	0.1203	1.0000	
tempéra	3-25juil	0.0468	55.5	39.18	0.41	12.40	0.40	2.2E-02	2.0E-03	0.1763	0.9999	
tempéra	1-23juil	0.0468	58.5	69.81	0.85	29.34	0.97	4.8E-02	4.5E-03	1.4927	0.9998	0.9875
tempéra	2-23juil	0.0468	58.5	71.91	0.86	29.38	1.00	5.0E-02	4.8E-03	1.6036	0.9998	0.9867
tempéra	1-1012aout	0.0500	55.5	70.78	0.57	24.60	0.96	3.0E-02	2.9E-03	0.8936	0.9999	0.9856
tempéra	2-1012aout	0.0500	58.5	72.53	0.30	25.59	0.60	6.4E-02	3.3E-03	0.4060	0.9999	0.9945
tempéra	3-1012aout	0.0500	51.5	69.60	0.60	29.60	0.65	8.8E-03	8.5E-04	0.6121	0.9999	0.9946
tempéra	4-1012aout	0.0500	54.5	69.88	0.60	27.42	0.70	1.5E-02	1.0E-03	0.7063	0.9999	0.9926
tempéra	1-2122aout	0.0450	53.5	57.59	0.63	9.17	0.55	8.0E-03	1.2E-03	0.1212	1.0000	0.9853
tempéra	2-2122aout	0.0450	47.5	57.34	1.38	19.76	1.22	3.7E-03	5.7E-04	0.6178	0.9999	0.9845
tempéra	3-2122aout	0.0450	56.9	58.23	0.27	11.40	0.31	3.4E-02	2.6E-03	0.1571	1.0000	0.9906
tempéra	4-2122aout	0.0450	54.7	57.93	0.43	18.90	0.61	2.7E-02	2.3E-03	0.6303	0.9999	0.9866
concent	1-31juil	0.0652	55.5	1.47	0.01	0.51	0.03	2.1E-02	2.5E-03	0.0010	0.9997	0.9712
concent	2-31juil	0.0417	55.5	0.94	0.01	0.36	0.02	1.8E-02	2.2E-03	0.0004	0.9997	0.9997
concent	3-31juil	0.0209	55.5	0.48	0.01	0.20	0.02	2.4E-02	3.9E-03	0.0003	0.9992	0.9418
concent	4-31juil	3.2600	55.5	74.67	0.49	30.98	1.11	1.9E-02	1.6E-03	0.7971	0.9999	0.9917
concent	5-31juil	1.6300	55.5	39.68	0.33	14.14	0.76	1.9E-02	2.3E-03	0.3760	0.9998	0.9802

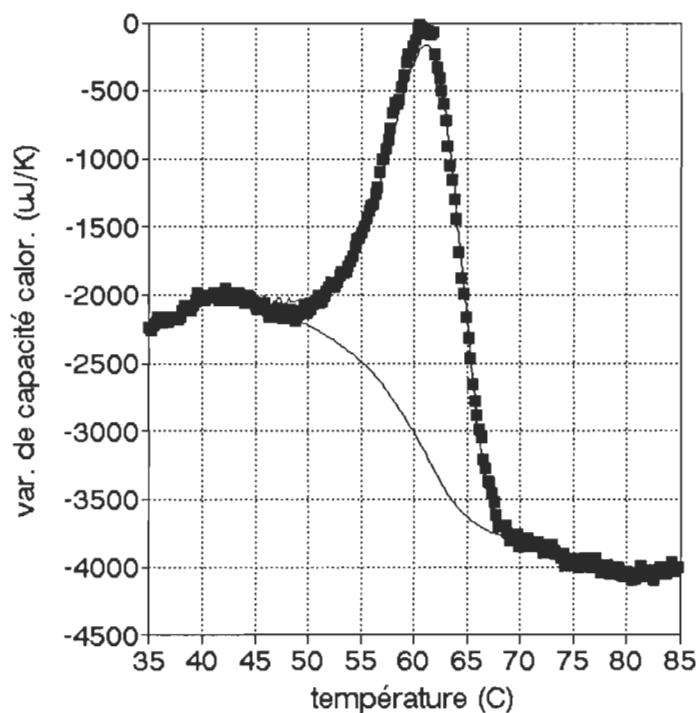
titre: Rel d'Arrhen obtenues à partir de mesures de fluorescence				
commentaire données brutes de la figure 16				
nom des fic	k min-1	1/t k-1	ln(k) sec-1	Regression Output:
2-25juil	0.001	0.00314	-10.60	Constant 76.8217
3-25juil	0.006	0.00310	-9.21	Std Err of Y Est 0.28008
4-25juil	0.022	0.00304	-7.90	R Squared 0.94368
1-23juil	0.048	0.00302	-7.14	No. of Observations 13
2-23juil	0.050	0.00302	-7.10	Degrees of Freedom 11
1-1012a	0.030	0.00304	-7.60	
2-1012a	0.064	0.00302	-6.85	X Coefficient -27812
3-1012a	0.009	0.00308	-8.83	Std Err of Co 2048.5
4-1012a	0.014	0.00305	-8.33	
1-2122a	0.008	0.00306	-8.93	
1-2122a	0.004	0.00312	-9.71	Ea 231 DEa 17
1-2122a	0.034	0.00303	-7.48	ln(A) 76.8 Dln(A) 0.28
1-2122a	0.027	0.00305	-7.72	

### TABLEAU RECAPITULATIF

titre: dénaturation thermique de l'actine G  
version du log 4

nom du fichier: a:\scnr12a.o3c compress des donn  
fact 2  
rti+ 0  
modèle considéré dénat. therm. irréré rtf- 0

conc(mg/ml)	3.43	Tm(C):	60.50	ligne de	droite	sigmoïde	unite
vol(ml)	0.5	Ti(C):	48.19	Qt	27587.17	26712.3	uJ
P.M.	42500	Tf(C):	69.03	DH	683.647	661.968	kJ/mole
S.R. (C/sec)	0.0104			DH(vh)	417.5126	426.043	kJ/mole
température critique pour l'obtention d'une si				r coop.	0.610714	0.6436	(vh/cal
Ti1	42.5558	temper init de regress pour		Ea		0.000	284.523
Tf1	48.1929	temper final de regress pour		ln(A)		0.00	96.4667
Ti2	69.0314	temper init de regress pour		n			1.0008
Tf2	80.0182	temper final de regress pour				ordre 1	ordre n



titre:		Relation d'Arrhenius obtenues à partir des données de la figure 18						
commentaire		données illustrées à la figure 19						
fichier:		IANNEX07						
1/T K <sup>^</sup> (-1)	ln(k) sec <sup>^</sup> (-1)	1/T K <sup>^</sup> (-1)	ln(k) sec <sup>^</sup> (-1)	1/T K <sup>^</sup> (-1)	ln(k) sec <sup>^</sup> (-1)	Regression:		
3.0731E-03	-8.701	3.0332E-03	-7.340	2.9944E-03	-5.975	O		96.4638
3.0721E-03	-8.764	3.0323E-03	-7.296	2.9935E-03	-5.945	DO		0.447
3.0711E-03	-8.783	3.0313E-03	-7.238	2.9925E-03	-5.926	P		-34224
3.0701E-03	-8.705	3.0304E-03	-7.201	2.9916E-03	-5.890	DP		148.2
3.0691E-03	-8.669	3.0294E-03	-7.145	2.9907E-03	-5.858	chi 2		0.00299
3.0682E-03	-8.619	3.0284E-03	-7.137	2.9898E-03	-5.818	r 2		0.9999
3.0672E-03	-8.583	3.0275E-03	-7.116	2.9888E-03	-5.779	ceff. det		0.9978
3.0662E-03	-8.489	3.0265E-03	-7.081	2.9879E-03	-5.756			
3.0652E-03	-8.421	3.0256E-03	-7.044	2.9870E-03	-5.721			
3.0642E-03	-8.400	3.0246E-03	-7.023	2.9860E-03	-5.673			
3.0633E-03	-8.365	3.0237E-03	-6.978	2.9851E-03	-5.661	Ea	284.536	1.23213
3.0623E-03	-8.399	3.0227E-03	-6.931	2.9842E-03	-5.644	ln(	96.4638	0.447
3.0613E-03	-8.417	3.0218E-03	-6.906	2.9832E-03	-5.612			
3.0603E-03	-8.363	3.0208E-03	-6.861	2.9823E-03	-5.597			
3.0594E-03	-8.343	3.0199E-03	-6.819	2.9814E-03	-5.559			
3.0584E-03	-8.261	3.0189E-03	-6.791	2.9805E-03	-5.534			
3.0574E-03	-8.269	3.0180E-03	-6.747	2.9795E-03	-5.513			
3.0564E-03	-8.184	3.0170E-03	-6.746	2.9786E-03	-5.478			
3.0555E-03	-8.167	3.0161E-03	-6.717	2.9777E-03	-5.441			
3.0545E-03	-8.101	3.0151E-03	-6.699	2.9768E-03	-5.414			
3.0535E-03	-8.072	3.0142E-03	-6.670	2.9759E-03	-5.376			
3.0525E-03	-7.993	3.0132E-03	-6.637	2.9749E-03	-5.359			
3.0516E-03	-7.927	3.0123E-03	-6.594	2.9740E-03	-5.349			
3.0506E-03	-7.906	3.0113E-03	-6.554	2.9731E-03	-5.328			
3.0496E-03	-7.915	3.0104E-03	-6.519	2.9722E-03	-5.305			
3.0487E-03	-7.873	3.0094E-03	-6.478	2.9712E-03	-5.276			
3.0477E-03	-7.832	3.0085E-03	-6.439	2.9703E-03	-5.243			
3.0467E-03	-7.805	3.0075E-03	-6.403	2.9694E-03	-5.205			
3.0458E-03	-7.760	3.0066E-03	-6.375	2.9685E-03	-5.185			
3.0448E-03	-7.731	3.0057E-03	-6.370	2.9676E-03	-5.141			
3.0438E-03	-7.705	3.0047E-03	-6.330	2.9667E-03	-5.118			
3.0429E-03	-7.653	3.0038E-03	-6.293	2.9657E-03	-5.082			
3.0419E-03	-7.608	3.0028E-03	-6.259	2.9648E-03	-5.063			
3.0409E-03	-7.570	3.0019E-03	-6.231	2.9639E-03	-5.070			
3.0400E-03	-7.521	3.0010E-03	-6.197	2.9630E-03	-5.040			
3.0390E-03	-7.517	3.0000E-03	-6.161	2.9621E-03	-5.030			
3.0380E-03	-7.513	2.9991E-03	-6.121	2.9612E-03	-5.005			
3.0371E-03	-7.483	2.9982E-03	-6.086	2.9603E-03	-4.960			
3.0361E-03	-7.445	2.9972E-03	-6.050	2.9594E-03	-4.947			
3.0351E-03	-7.398	2.9963E-03	-6.017	2.9584E-03	-4.916			
3.0342E-03	-7.374	2.9953E-03	-6.000					

titre:		Relation Tm versus S.R.; actine G				
commentaire		données illustrées à la figure 21				
fichier:		1ANNEX08				
no	S.R.	Tm	1/Tm	ln(v/Tm)	ln(sr/T)	Regression y=O+P*X
1	9.0	56.714	0.00303	-17.589	-17.341	O 71.4833
2	27.8	58.714	0.00301	-16.473	-16.806	DO 17.55
3	37.5	60.857	0.00299	-16.187	-16.239	P -29300
4	67.3	63.714	0.00297	-15.619	-15.495	DP 6596
						chi 2 0.00015
						r^2 1.0000
						coeff. dét. 0.9998
						Ea 243.6 +/- 54.8391
						ln(A) 81.7686 +/- 0.09797

$$D\ln(A) = DA/A = ((DO/O)^2 - (DEa/Ea)^2)^{0.5}$$

titre:	effet de la concentration sur la dénaturation de l'actine F												
comment.	données brutes de la figure 22												
fichier:	1ANNEX09								tempér.:		59 C		
date:	29 avril 1992								conc.:		0.29 mg/ml		
								échelle Y:		*128			
no	temps min	concentration: 3 mg/ml				concentration: 1 mg/ml				concentration: 0.3 mg/ml			
		série 1	série 2	série 3	moyenne	série 1	série 2	série 3	moyenne	série 1	série 2	série 3	moyenne
1	0	59.0	58.0	61.5	59.5	58.8	59.0	61.4	59.7	59.8	59.5	61.6	60.3
2	6	58.7	59.1	60.4	59.4	58.1	57.8	59.0	58.3	55.8	56.7	56.1	56.2
3	12	58.6	58.8	56.2	57.9	51.3	52.1	52.9	52.1	48.9	48.9	49.2	49.0
4	18	55.3	55.0	53.1	54.5	51.1	50.8	49.3	50.4	47.2	47.6	44.6	46.5
5	30	49.6	50.0	48.9	49.5	44.1	44.7	45.3	44.7	35.8	36.6	36.8	36.4
6	41	45.6	45.5	44.2	45.1	34.5	35.0	35.5	35.0	29.2	29.8	27.7	28.9
7	60	36.8	36.9	35.1	36.3	30.5	30.3	29.5	30.1	15.6	15.6	17.7	16.3
8	80	33.1	33.3	30.8	32.4	20.0	20.3	20.9	20.4	11.1	11.6	8.5	10.4
9	100	24.9	25.0	26.9	25.6	14.1	14.0	16.3	14.8	4.1	3.7	7.2	5.0
10	122	20.2	20.7	20.5	20.5	9.8	8.8	12.2	10.3	3.8	4.2	5.6	4.5
11	150	17.8	17.8	15.2	16.9	7.5	7.8	7.5	7.6	4.8	4.5	5.7	5.0
12	200	9.6	8.8	11.7	10.0	3.3	2.5	2.6	2.8	2.7	2.4	3.9	3.0

paramètres		ordre n ordre 1				ordre n ordre 1				ordre n ordre 1			
f		20.608				61.158				211.71			
n		0.7937				0.7647				0.8288			
k		0.0098 0.0073				0.0116 0.0116				0.0148 0.0206			
A		-6.413				-4.608				0.3108			
B		68.493				68.214				62.694			
		concentration 3 mg/ml				concentration 1 mg/ml				concentration 0.3 mg/ml			
no	temps min	moy	err	ordre n	ordre 1	moy	err	ordre n	ordre 1	moy	err	ordre n	ordre 1
1	0	59.5	1.78	61.8	62.1	59.7	1.45	61.2	61.6	60.3	1.17	63.5	63.0
2	6	59.4	0.90	59.0	59.1	58.3	0.58	57.0	57.2	56.2	0.42	56.9	55.7
3	12	57.9	1.44	56.3	56.3	52.1	0.78	53.1	53.0	49.0	0.21	50.8	49.3
4	18	54.5	1.19	53.6	53.6	50.4	0.98	49.4	49.1	46.5	1.63	45.3	43.6
5	30	49.5	0.54	48.6	48.6	44.7	0.58	42.5	42.1	36.4	0.56	35.8	34.1
6	41	45.1	0.74	44.4	44.3	35.0	0.47	36.9	36.5	28.9	1.05	28.6	27.3
7	60	36.3	1.01	37.8	37.7	30.1	0.54	28.6	28.4	16.3	1.17	19.0	18.5
8	80	32.4	1.36	31.7	31.7	20.4	0.47	21.5	21.6	10.4	1.63	11.9	12.4
9	100	25.6	1.12	26.4	26.5	14.8	1.30	15.8	16.1	5.0	1.89	7.2	8.3
10	122	20.5	0.25	21.4	21.6	10.3	1.73	10.9	11.5	4.5	0.95	3.9	5.4
11	150	16.9	1.51	16.2	16.4	7.6	0.15	6.5	7.0	5.0	0.64	1.6	3.2
12	200	10.0	1.51	9.4	9.4	2.8	0.44	2.1	1.9	3.0	0.78	0.2	1.3

ordre n =

$f*(c^{(1-n)} - (1-n)*k*t)^{(1/(1-n))}$

ordre 1 =

$A + B*exp(-kt)$

o: concentration

n: ordre

k: oonstante de vitesse

t: temps

relation entre le temps de demi-vie et la concentration				données brutes de la figure 23	
t1/2	c	ln(t1/2)	ln(c)	Regression Output:	
min.	mg/ml			Constant	3.9829 X Coefficient(s) 0.3923
82.4	3.0	4.412	1.099	Std Err of Y Est	0.0052 Std Err of Coef 0.0032
53.9	1.0	3.987	0.000	R Squared	0.9999
33.4	0.3	3.509	-1.204	No. of Observations	3
				Degrees of Freedom	1 pente = 1-n; ordre= 0.6077

titre: effet de la température sur la dénaturation de l'actine F									
commentaire données brutes de la figure 24									
fichier:	IANNEX10					paramètres	ordre n	ordre n fi	ordre 1
date:	25 mars 1992					f	202.496	195.0607	
série	1					n	1.0435	fixe	
temper.:	62 C					k	0.0597	0.0278	0.0589
conc.:	0.29 mg/ml					A			1.6384
échelle Y:	128					B			57.2672
no	temps min	valeurs expérimentales					valeurs théoriques		
		série 1	série 2	série 3	moyenne	err	ordre n	ordre n fi	ordre 1
1	0.0	55.8	56.3	55.9	56.0	0.26	58.7	56.6	58.9
2	2.0	53.8	53.6	53.8	53.7	0.12	52.5	51.8	52.5
3	4.0	46.8	48.8	50.8	48.8	2.00	46.9	47.3	46.9
4	6.0	42.5	42.3	44.2	43.0	1.04	41.9	43.1	41.9
5	10.0	32.6	38.6	33.0	34.7	3.35	33.6	35.4	33.4
6	15.0	22.8	23.8	23.6	23.4	0.53	25.5	27.0	25.3
7	20.0	16.2	16.6	18.8	17.2	1.40	19.5	20.1	19.3
8	25.0	13.3	15.0	18.4	15.6	2.60	14.9	14.4	14.8
9	30.0	16.0	9.3	9.5	11.6	3.81	11.4	9.9	11.4
10	40.0	4.6	6.3	7.5	6.1	1.46	6.8	3.8	7.1
11	50.0	5.3	3.8	4.7	4.6	0.75	4.1	0.9	4.7
12	60.0	4.6	5.2	3.6	4.5	0.81	2.5	0.0	3.3
ordre n fixe = 0.61									
ordre n = $f \cdot (c^{(1-n)} - (1-n) \cdot k \cdot t)^{1/(1-n)}$						o: concentration			
ordre 1 = $A + B \cdot \exp(-kt)$						n: ordre			
						k: constante de vitesse			
						t: temps			

titre: effet de la température sur la dénaturation de l'actine F									
commentaire données brutes de la figure 24									
fichier:	IANNEX10					paramètres	ordre n	ordre n fi	ordre 1
date:	27 mars 1992					f	200.3584	198.7719	
série	2					n	0.8428	fixe	
temper.:	58 C					k	0.0138	0.00945	0.0172
conc.:	0.29 mg/ml					A			-2.1888
échelle Y:	128					B			60.7104
no	temps min	valeurs expérimentales					valeurs théoriques		
		série 1	série 2	série 3	moyenne	err	ordre n	ordre n fi	ordre 1
1	0.0	56.9	57.5	56.3	56.9	0.60	58.1	57.6	58.5
2	6.0	53.3	52.0	52.6	52.6	0.65	52.5	52.7	52.6
3	12.5	46.5	48.5	47.8	47.6	1.01	47.0	47.7	46.8
4	18.0	42.2	41.2	47.0	43.5	3.10	42.7	43.7	42.4
5	25.0	39.0	40.2	38.0	39.1	1.10	37.7	38.9	37.3
6	35.0	29.8	31.5	31.0	30.8	0.87	31.4	32.6	31.1
7	45.0	22.0	23.0	24.0	23.0	1.00	26.0	27.1	25.8
8	60.0	21.0	20.6	19.3	20.3	0.89	19.4	20.0	19.4
9	75.0	7.5	13.0	11.0	10.5	2.78	14.0	13.9	14.2
10	100.0	4.3	5.2	6.2	5.2	0.95	8.3	7.2	8.7
11	125.0	4.2	3.6	5.5	4.4	0.97	4.6	2.9	4.9
12	150.0	2.9	4.0	4.7	3.9	0.91	2.4	0.8	2.4
ordre n fixe = 0.61									
ordre n = $f \cdot (c^{(1-n)} - (1-n) \cdot k \cdot t)^{1/(1-n)}$						c: concentration			
ordre 1 = $A + B \cdot \exp(-kt)$						n: ordre			
						k: constante de vitesse			
						t: temps			

titre: effet de la température sur la dénaturation de l'actine F									
commentaire données brutes de la figure 24									
fichier:	IANNEX11					paramètres	ordre n	ordre n fi	ordre 1
date:	29 mars 1992					f	202.1248	200.4202	
série	3					n	0.8776	fixe	
temper.:	56 C					k	0.009208	0.005959	0.0112
conc.:	0.29 mg/ml					A			-0.88192
échelle Y:	128					B			59.8912
no	temps min	valeurs expérimentales					valeurs théoriques		
		série 1	série 2	série 3	moyenne	err	ordre n	ordre n fi	ordre 1
1	0.0	55.8	54.8	56.5	55.7	0.85	58.6	58.1	59.0
2	7.0	54.9	54.5	53.5	54.3	0.72	54.4	54.4	54.5
3	14.0	51.9	52.8	51.0	51.9	0.90	50.4	50.9	50.3
4	21.0	48.8	49.8	47.3	48.6	1.26	46.7	47.5	46.5
5	30.0	45.8	46.0	41.3	44.4	2.66	42.2	43.4	41.9
6	45.0	36.5	39.8	32.0	36.1	3.92	35.7	37.0	35.3
7	60.0	28.8	30.6	25.5	28.3	2.59	30.0	31.3	29.7
8	82.0	18.5	20.8	18.3	19.2	1.39	23.1	23.9	23.0
9	100.0	14.5	22.8	18.8	18.7	4.15	18.6	18.9	18.7
10	125.0	8.6	9.3	10.6	9.5	1.01	13.6	13.0	13.9
11	160.0	5.6	9.1	7.6	7.4	1.76	8.6	7.0	9.1
12	220.0	5.9	4.8	4.6	5.1	0.70	3.6	1.5	4.2
ordre n fixe = 0.61									
ordre n = $f \cdot (c^{(1-n)} - (1-n) \cdot k \cdot t)^{1/(1-n)}$						c: concentration			
ordre 1 = $A + B \cdot \exp(-kt)$						n: ordre			
						k: constante de vitesse			
						t: temps			

titre: effet de la température sur la dénaturation de l'actine F									
commentaire données brutes de la figure 24									
fichier:	IANNEX11					paramètres	ordre n	ordre n fi	ordre 1
date:	31 mars 1992					f	204.1856	200.4998	
série	4					n	0.9109	fixe	
temper.:	54 C					k	0.004689	0.002889	0.005649
conc.:	0.29 mg/ml					A			0.84288
échelle Y:	128					B			58.7776
no	temps min	valeurs expérimentales					valeurs théoriques		
		série 1	série 2	série 3	moyenne	err	ordre n	ordre n fi	ordre 1
1	0.0	56.5	56.8	54.2	55.8	1.42	59.2	58.1	59.6
2	11.0	55.6	54.0	54.6	54.7	0.81	55.9	55.3	56.1
3	22.0	54.3	53.5	51.5	53.1	1.44	52.7	52.6	52.8
4	33.0	53.9	55.0	49.8	52.9	2.74	49.8	49.9	49.6
5	52.0	51.8	45.0	45.0	47.3	3.93	44.9	45.6	44.7
6	83.0	47.5	38.5	37.0	41.0	5.68	38.0	39.0	37.6
7	106.0	40.0	31.8	32.0	34.6	4.68	33.5	34.5	33.1
8	142.0	32.5	23.5	23.0	26.3	5.35	27.4	28.2	27.2
9	177.0	22.6	16.3	16.0	18.3	3.73	22.5	22.8	22.5
10	212.0	16.8	13.6	12.0	14.1	2.44	18.4	18.1	18.6
11	265.0	14.0	15.8	11.5	13.8	2.16	13.5	12.3	14.0
12	353.0	14.0	12.0	12.0	12.7	1.15	7.9	5.6	8.8
ordre n fixe = 0.61									
ordre n = $f \cdot (c^{(1-n)} - (1-n) \cdot k \cdot t)^{1/(1-n)}$						c: concentration			
ordre 1 = $A + B \cdot \exp(-kt)$						n: ordre			
						k: constante de vitesse			
						t: temps			

titre: Princ. param. mes. par var. d'int. de fluor.							
commentaire données brutes de la figure 25							
fichier:		1ANNEX12			synthèse lannex09-1annex11		
		avec un n = 0.61			avec un n = 1		
ordonn.							
pente							
Ea	kJ	247.5145	+/-	17	257.2709	+/-	17
ln(A)	ln	81.1132	+/-	0.11086	85.32428	+/-	0.11108
T	1/T	k	ln(ksec-1 exper	ln(ksec theor.	k	ln(ksec-1 exper	ln(ksec theor.
54	0.00306	0.0029	-9.9412	-9.8873	0.0056	-9.2706	-9.2632
56	0.00304	0.0060	-9.2172	-9.3343	0.0112	-8.5862	-8.6885
58	0.00302	0.0095	-8.7561	-8.7881	0.0172	-8.1572	-8.1207
59	0.00301	0.0105	-8.6507	-8.5174	0.0206	-7.9768	-7.8393
62	0.00298	0.0278	-7.6771	-7.7151	0.0589	-6.9263	-7.0054
Regression Output:							
Constant		81.1132			85.32428		
Std Err of Y Est		0.11086			0.111075		
R Squared		0.986591			0.987529		
No. of Observations		5			5		
Degrees of Freedom		3			3		
X Coefficient(s)		-29770.8			-30944.3		
Std Err of Coef.		2003.801			2007.647		



### TABLEAU RECAPITULATIF

titre: denaturation thermique actine F

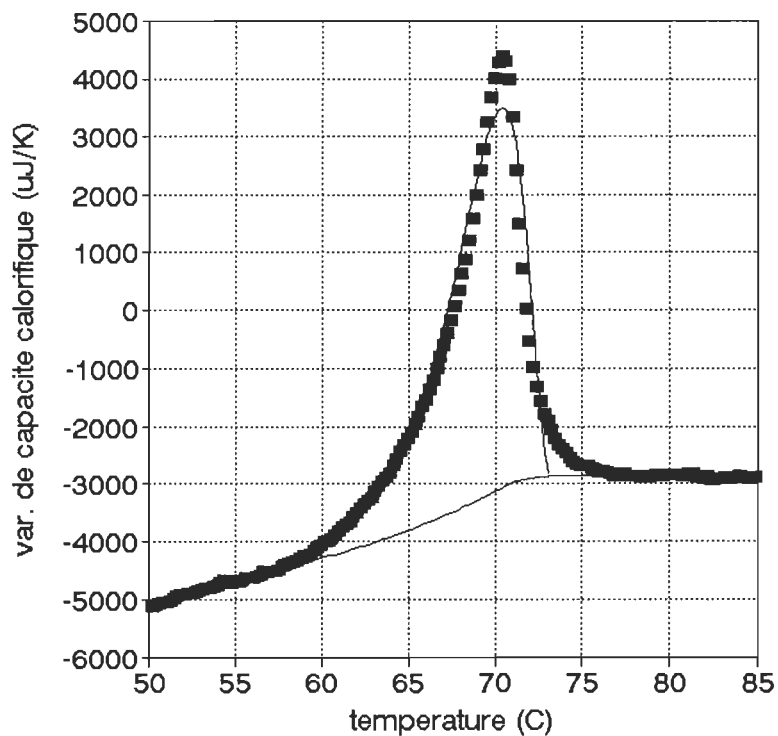
nom du fichier: a:\scnr34a.t2c      compress des donn

fact 2

rti+ 0

modele considere denaturation thermiq irreversible fractionnair rtf- 27

conc(mg/ml)	3.55	Tm(C):	70.35	ligne de Base	droit	sigmoide	unite
vol(ml)	0.5	Ti(C):	57.88	param err			
P.M.	42500	Tf(C):	76.77	Qt	38957	37008	uJ
S.R. (C/sec)	0.010417			DH	932.77	886.11	kJ/mole
temperature critique pour l'obtention d'une sigmo				DH(vh)	782.7	790.14	kJ/mole
				r coop.	0.8391	0.8917	(vh/cal
				Ea	52.68	0.000	389.9448
Ti1	52.2556	temper init de regress pour Cpn	ln(A)	0.157		0.00	131.0817
Tf1	57.4641	temper final de regress pour Cpn	n	0.004			0.676822
Ti2	77.18	temper init de regress pour Cpd				ordre	ordre n
Tf2	82.1343	temper final de regress pour Cpd					



titre:		Relation Tm versus S.R.; actine F				
commentaire		données illustrées à la figure 36				
fichier:		1ANNEX13				
no	S.R.	Tm	1/Tm	ln(v/Tm)	ln(sr/T)	Regression y=O+P*X
1	18.33	67.50	0.00294	-16.942	-16.907	O 72.9798
2	27.80	68.60	0.00293	-16.532	-16.618	DO 8.2
3	37.47	70.30	0.00291	-16.243	-16.174	P -30620
4	57.20	71.10	0.00290	-15.825	-15.967	DP 2811
5	46.48	71.36	0.00290	-16.034	-15.900	chi 2 0.00637
						r^2 1.0000
						coeff. dét. 0.9753
						Ea 254.575 +/- 23.3707
						ln(A) 83.3092 +/- 0.06478

# TABLEAU RECAPITULATIF

titre: denaturation thermique act F + Ph

nom du fichier: E:\data\actph\scnr34a.t3c compress des donn

fact 2

rti+ 3

modele considere denaturation thermiq irreversible fractionnai rtf- 27

conc(mg/ml)	3.55	Tm(C):	84.40	ligne de Base	droit	sigmoide	unite
vol(ml)	0.5	Ti(C):	70.14	Qt	46106	42084	uJ
P.M.	42500	Tf(C):	90.16	DH	1103.9	1007.6	kJ/mole
S.R. (C/sec)	0.01033			DH(vh)	708.78	743.96	kJ/mole
temperature critique pour l'obtention d'une sigmo				r coop.	0.642	0.7383	(vh/cal
				Ea		0.000	503.79
Ti1	58.0886	temper init de regress pour Cpn	ln(A)			0.00	164.464
Tf1	70.1415	temper final de regress pour Cpn					1.34346
Ti2	90.1589	temper init de regress pour Cpd				ordre	ordre n
Tf2	94.0538	temper final de regress pour Cpd					

